СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА ОТРАВЛЕНИЙ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ

Я. С. СМУСИН

Глава I

Холинэстераза и антихолинэстеразные вещества (Краткие сведения)

Биологическая роль холинэстеразы

Антихолинэстеразные вещества и их практическое применение

Общие сведения об отравлении антихолинэстеразными веществами

Глава II

Методы определения холинэстеразы

Биологический метод

Биохимический метод

Гистохимический метод

Глава III

Активность холинэстераз в здоровом организме и при некоторых патологических состояниях

Уровень холинэстеразной активности крови

Уровень активности холинэстеразы органов и тканей

Активность холинэстеразы головного мозга, определяемая в «кусочке неразведенной ткани»

Состояние активности холинэстеразы тканей в зависимости от давности смерти

Глава IV

Отравления антихолинэстеразными веществами необратимого действия и их посмертная диагностика

Глава V

Отравления антихолинэстеразными веществами обратимого действия и их посмертная диагностика

Глава VI

Схема судебно-медицинской диагностики отравлений антихолинэстеразными веществами

БИБЛИОТЕКА ПРАКТИЧЕСКОГО ВРАЧА

ОЖОГИ

Я.

Изд

БИБЛИОТЕКА ПРАКТИЧЕСКОГО ВРАЧА

СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА ОТРАВЛЕНИЙ АНТИХОЛИН-ЭСТЕРАЗНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ

•

Я. С. СМУСИН

Издательство «Медицина» Москва · 1968

УДК 340.627 : 615.785.4

Работа посвящена одному из актуальных вопросов судебно-медицинской экспертизы — экспертизе отравлений антихолинэстеразными веществами. В ней подробно и на современном научном уровне рассматривается биологическая роль холинэстеразы и механизм действия антихолинэстеразных веществ, подробно рассматриваются вопросы практического применения антихолинэстеразных веществ, различные методы определения холинэстеразы.

Автором разработана методика диагностики отравлений антихолинэстеразными веществами по степени угнетения холинэстеразы в разных органах и тканях. Методические рекомендации автора по судебно-медицинской диагностике отравлений несомненно будут способствовать решению указанных вопросов на высоком научном уровне.

Книга рассчитана на судебно-медицинских экспертов, но может быть полезной и врачам других специальностей, а также судебным химикам, биохимикам и работникам судебно-следственных органов.

В книге содержится 37 рисунков и 30 таблиц. Библиографический указатель содержит 142 источника.

5—4
281—68

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 3
Глава I. **Холинэстераза и антихолинэстеразные вещества (Краткие сведения)** 5
Биологическая роль холинэстеразы 5
Антихолинэстеразные вещества и их практическое применение 8
Общие сведения об отравлении антихолинэстеразными веществами 14
Глава II. **Методы определения холинэстеразы** 29
Биологический метод 30
Биохимический метод 40
Гистохимический метод 45
Глава III. **Активность холинэстераз в здоровом организме и при некоторых патологических состояниях** 58
Уровень холинэстеразной активности крови 58
Уровень активности холинэстеразы органов и тканей . 66
Активность холинэстеразы головного мозга, определяемая в «кусочке неразведенной ткани» 75
Состояние активности холинэстеразы тканей в зависимости от давности смерти 80
Глава IV. **Отравления антихолинэстеразными веществами необратимого действия и их посмертная диагностика** . 85
Глава V. **Отравления антихолинэстеразными веществами обратимого действия и их посмертная диагностика** . . 138
Глава VI. **Схема судебно-медицинской диагностики отравлений антихолинэстеразными веществами** 178
Литература 182

Смусин Яков Семенович
Судебно-медицинская экспертиза отравлений антихолинэстеразными веществами

Редактор *В. В. Томилин*
Техн. редактор *Н. А. Пошкребнева* Корректор *Н. П. Проходцева*
Художественный редактор *Т. М. Дмитриев*

Сдано в набор 11/III 1968 г. Подписано к печати 24/IX 1968 г. Формат бумаги 84×108 1/32=6,0 печ. л.+0,19 печ. л. вкл. (условных 10,40 л.) 10,32 уч.-изд. л. Бум. тип. № 1. Тираж 5000 экз. Т 12813 МН—73.

Издательство «Медицина». Москва Петроверигский пер., 6/8.
Типография изд-ва «Горьковская правда», г. Горький, ул. Фигнер, 32.
Заказ 5272. Цена 1 р. 13 коп.

ВВЕДЕНИЕ

Вещества антихолинэстеразного действия имеют очень большое и все возрастающее значение в химии, медицине и во многих областях народного хозяйства. Биологическое действие этих веществ связано с угнетением холинэстеразы.

Как известно, холинэстераза является высокоспециализированным ферментом, необходимым для нормальной функции так называемых холинергических структур нервной системы. Этот фермент осуществляет гидролиз одного из медиаторов нервного возбуждения — ацетилхолина. Торможение активности холинэстеразы замедляет расщепление ацетилхолина. Происходящее вследствие этого накопление ацетилхолина обычно приводит к возбуждению соответствующих холинергических синапсов. Однако чрезмерное накопление ацетилхолина может полностью нарушить синаптическое проведение. Поэтому вещества, тормозящие холинэстеразу, обладают очень сильным действием на все синаптические структуры, в которых роль медиатора возбуждения играет ацетилхолин.

В настоящее время антихолинэстеразные вещества нашли широкое применение в медицине (в качестве лекарственных препаратов), в сельском хозяйстве (в качестве инсектицидов) и в военном деле (в качестве боевых отравляющих веществ). Многие антихолинэстеразные вещества (в особенности фосфорорганические соединения) обладают сильным ядовитым действием. Отравления веществами этой группы встречаются при их промышленном синтезе, практическом использовании в народном хозяйстве, медицине, а также в случаях суицидных попыток. Вот почему отравления веществами антихолинэстеразного действия в последнее время стали привлекать к себе большое внимание судебных медиков как в СССР, так и за рубежом.

Патологоанатомические признаки отравления веществами антихолинэстеразного действия неспецифичны,

судебно-химические методы сильно ограничены ввиду незначительных доз таких веществ, вызывающих смерть. Поэтому очень важно внедрять в экспертную практику методы посмертной диагностики отравлений антихолинэстеразными веществами по степени угнетения холинэстеразы. Такие методы важны в судебной медицине и для диагностики отравления некоторыми другими веществами, у которых антихолинэстеразное действие не является главным, но тоже сильно выражено.

Автор выражает глубокую благодарность своему учителю профессору Михаилу Яковлевичу Михельсону за большую помощь и руководство при выполнении многолетних исследований.

Глава I

ХОЛИНЭСТЕРАЗА И АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЕ ВЕЩЕСТВА

(Краткие сведения)

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Местом избирательного действия многих ядов является последнее звено рефлекторной дуги, т. е. область нервных окончаний. Это действие стало понятным благодаря открытию роли медиаторов в интернейрональной передаче нервных импульсов и в передаче их с нервных окончаний на исполнительные клетки или ткани.

Было установлено, что для парасимпатических нервов медиатором является ацетилхолин, а для симпатических нервов — адреналин и норадреналин. С точки зрения характера химической передачи нервных импульсов все вегетативные волокна подразделяются на холинергические, на окончаниях которых синтезируется ацетилхолин, и адренергические, передача импульсов с которых осуществляется адреналином и норадреналином. К холинергическим волокнам относятся все преганглионарные вегетативные волокна, постганглионарные волокна всех парасимпатических нервов, а также двигательные нервы. Ацетилхолин участвует также и в межнейронной передаче возбуждения. Наконец, в центральной нервной системе одним из передатчиков возбуждения с одного нейрона на другой является ацетилхолин.

Ацетилхолин представляет собой уксуснокислый эфир холина:

$$CH_3-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}\equiv(CH_3)_3\cdot\overset{-}{O}H$$

Процессы синтеза ацетилхолина осуществляются холинацетилазой при участии коэнзима А. Синтезированный ацетилхолин сохраняется в окончаниях холинергических нервов связанным с белком в неактивном комплексе. Под влиянием нервного импульса ацетилхолин высвобождается в синаптическую щель и вызывает деполяризацию постсинаптической мембраны. В дальнейшем

под влиянием фермента холинэстеразы происходит энзиматический гидролиз ацетилхолина с образованием холина и уксусной кислоты:

$$\left[\begin{array}{l} CH_2O{-}{-}COCH_3 \\ | \\ CH_2{-}{-}N(CH_3)_3 \end{array}\right]^{+} + H_2O \rightarrow \left[\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CH_2{-}{-}N(CH_3)_3 \end{array}\right]^{+} + CH_3COOH$$

Основные свойства холинэстеразы, ее строение, способы определения ее активности и механизм функционирования были установлены в многочисленных исследованиях. Подробный обзор литературы вопроса имеется в работах В. М. Карасика (1946), Nachmansohn, Berman (1946), М. Я. Михельсона (1948, 1957), Augustinsson (1948), Koelle и Gilman (1949), Whittaker (1951), Wilson (1951), Bergman (1958), O'Brien (1960), С. Н. Голикова и В. И. Розенгарта (1960, 1964), Koelle (1963), А. В. Кибякова (1964) и др.

Alles и Hawes (1940) нашли, что холинэстераза эритроцитов более активно расщепляет ацетилхолин, чем фермент, содержащийся в плазме. Они также установили, что ацетил-альфа-метилхолин гидролизуется холинэстеразой эритроцитов и холинэстеразой плазмы, а ацетил-бета-метилхолин — только энзимом, который находится в эритроцитах. В дальнейшем Nachmansohn и Rothenberg (1945) показали существование двух холинэстераз, которые отличаются по своим свойствам и распространению в организме. Эти холинэстеразы были названы истинной (специфической) холинэстеразой, или ацетилхолинэстеразой, и ложной (неспецифической), или псевдохолинэстеразой, или сывороточной холинэстеразой. Истинная холинэстераза найдена в нервной системе и эритроцитах, а также в области окончаний холинергических нервов. Истинная холинэстераза гидролизует ацетилхолин и ацетил-бета-метилхолин, но практически не разрушает многих других эстеров холина (бензоилхолин, бутирилхолин). В оптимальных условиях истинная холинэстераза гидролизует ацетилхолин с большей скоростью, чем другие эстеры холина. Для холинэстеразы эритроцитов оптимум pH равен 7,5—8,0. Истинная холинэстераза тормозится избытком субстрата.

Ложная холинэстераза обнаружена в плазме крови, белом веществе мозга, поджелудочной железе, печени, почках и в некоторых других органах и тканях. Этот фер-

мент гидролизует бензоилхолин, пропионилхолин, бутирилхолин, дихолиновые эстеры дикарбоновых кислот, но не расщепляет ацетил-бета-метилхолина. Оптимум pH для ложной холинэстеразы равен 8,5. Энзим не тормозится избытком субстрата.

Ацетилхолин, образующийся в холинергических синапсах при нервном возбуждении, гидролизуется только истинной холинэстеразой. Биологическое значение ложной холинэстеразы не выяснено. Ложная холинэстераза, видимо, тоже связана с метаболизмом ацетилхолина, но является, возможно, лишь вспомогательным ферментом (Thompson, 1953) или выполняет роль защитного механизма, гидролизующего ацетилхолин, который вследствие каких-то причин не разрушился истинной холинэстеразой (В. В. Португалов и В. А. Яковлев, 1953; А. Н. Панюков, 1963, и др.).

Не лишен интереса тот факт, что в опытах Mazur и Bodansky (1946) удалось снизить активность ложного фермента сыворотки крови почти до нуля без видимых патологических явлений.

Современное состояние вопроса о строении холинэстераз в отечественной литературе освещается в монографиях С. Н. Голикова и В. И. Розенгарта (1960, 1964), в обзорах М. Я. Михельсона, Э. В. Зеймаль, Н. К. Фруентова и В. А. Яковлева (1961), В. А. Яковлева (1962), Э. В. Зеймаль, М. Я. Михельсона и Н. К. Фруентова (1962), М. И. Кабачника, А. П. Бресткина и М. Я. Михельсона (1965).

Согласно литературным данным, холинэстераза представляет собой крупную белковую молекулу, на поверхности которой имеются функциональные группы, способные катализировать гидролиз ацетилхолина. Гидролиз молекулы ацетилхолина осуществляется в пределах одного так называемого активного центра холинэстеразы. В состав активного центра входит по крайней мере две функциональные группы. Одна из них имеет отрицательный заряд и представлена, по-видимому, карбоксилат-анионом двухосновной аминокислоты или фосфат-анионом. Эта группа получила название анионного центра. Второй пункт активного центра поверхности холинэстеразы представлен, возможно, водородом гидроксила серина, на котором имеется дефицит электронов. Этот пункт назван эстеразным, или эстератическим.

На эстеразном пункте непосредственно происходит гидролиз сложноэфирной связи молекулы ацетилхолина. Анионный пункт в реакции гидролиза ацетилхолина принимает меньшее участие.

У разных холинэстераз активный центр по строению, видимо, различается. Об этом свидетельствует и тот факт, что в 1 минуту на активном центре истинной холинэстеразы может гидролизоваться до 300 000, а на активном центре ложной холинэстеразы только около 60 000 молекул ацетилхолина.

АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЕ ВЕЩЕСТВА И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Очень многие вещества обладают способностью угнетать активность холинэстеразы. Однако к антихолинэстеразным веществам относятся только такие вещества, у которых угнетение холинэстеразы играет главную роль в их фармакологических и токсикологических эффектах. Антихолинэстеразные вещества могут в равной мере действовать и на истинную, и на ложную холинэстеразу, но могут являться и избирательными ингибиторами только одного из этих ферментов.

Антихолинэстеразные вещества, вступая в соединение с холинэстеразой, лишают ее способности расщеплять ацетилхолин. В результате этого происходит накопление ацетилхолина в организме и как следствие — перевозбуждение холинергических структур. Фармакологические и токсические эффекты действия ингибиторов холинэстеразы являются результатом угнетения прежде всего истинной холинэстеразы.

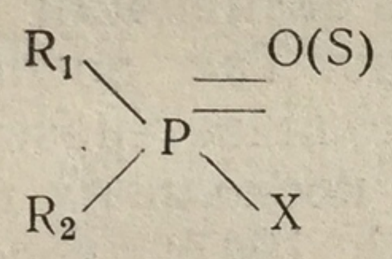
Механизм взаимодействия холинэстеразы с ее ингибиторами очень напоминает механизм взаимодействия холинэстеразы с ацетилхолином с той лишь разницей, что комплекс ингибитор — энзим является более прочным. По прочности связи и механизму взаимодействия с холинэстеразой антихолинэстеразные вещества подразделяются на *обратимые ингибиторы*, которые образуют с холинэстеразой относительно нестойкий комплекс, и на *необратимые ингибиторы*, которые с холинэстеразой образуют прочный комплекс ингибитор—энзим, не подвергающийся гидролизу или подвергающийся гидролизу в тысячи раз медленнее, чем ацетилированная при действии ацетилхолина холинэстераза.

К обратимым ингибиторам холинэстеразы относятся эзерин, прозерин, препараты № 1250 (избирательный ингибитор истинной холинэстеразы), № 683 (избирательный ингибитор ложного фермента), препараты 302JS, 306JS, 3318CT, 284C51, митолон и другие. Некоторые из этих препаратов являются очень сильными ингибиторами холинэстеразы.

Список веществ, угнетающих холинэстеразу, имеется в монографиях С. Н. Голикова и В. И. Розенгарта (1960, 1964), O'Brien (1960), Koelle (1963).

Ингибиторы типа эзерина могут конкурировать с ацетилхолином за вступление в соединение одними и теми же активными группами холинэстеразы. Степень угнетения холинэстеразы зависит не только от концентрации ингибитора, но и от исходной концентрации субстрата (М. Я. Михельсон, 1948): чем выше концентрация ацетилхолина, тем слабее угнетение.

К необратимым ингибиторам холинэстеразы относятся прежде всего фосфорорганические соединения (ФОС), имеющие общую формулу:



Здесь X — радикал, отщепляющийся от молекулы ФОС в процессе ее реакции с холинэстеразой.

Механизм реакции ингибиторов необратимого типа (в частности, ФОС) с холинэстеразой сводится к следующему. Фосфорорганические ингибиторы взаимодействуют с теми же активными пунктами холинэстеразы, с которыми реагирует и ацетилхолин. Но так как большинство ФОС не диссоциируют в водных растворах, то, видимо, взаимодействуют они только с эстеразным пунктом холинэстеразы. Вначале образуется обратимый комплекс ингибитор — энзим, затем активность холинэстеразы утрачивается необратимо вследствие ацетилирования эстеразного пункта фермента остатком фосфорной кислоты (образуется неактивная фосфорилированная холинэстераза).

Почти для всех фосфорорганических соединений характерна высокая избирательность действия на ложную холинэстеразу.

В последние годы было показано, что ФОС, содержащие четвертичный атом азота, в несколько раз активнее своих третичных аналогов. Появление катионной группы в молекуле значительно усиливает и действие серусодержащих ФОС. Очевидно, такое усиление действия связано с тем, что содержащая катионную группу молекула ФОС способна реагировать не только с эстеразным, но, подобно ацетилхолину, и с анионным пунктом активного центра холинэстеразы.

В механизме действия ингибиторов холинэстеразы, помимо антихолинэстеразного эффекта, может иметь значение и прямое (например, никотиномиметическое) действие, особенно в тех случаях, когда в организм введены большие дозы антихолинэстеразных веществ.

Антихолинэстеразные вещества, обладающие обратимым действием (например, эзерин, прозерин), после введения в организм довольно быстро (в течение 2—4 часов) подвергаются гидролизу, и активность холинэстеразы полностью восстанавливается.

При действии необратимых антихолинэстеразных веществ восстановление активности холинэстеразы происходит крайне медленно. Так, после действия ДФФ восстановление ложной холинэстеразы крови полностью завершается в течение нескольких недель (Grob, Harvey, Langworthy, Lilienthal, 1947), восстановление истинной холинэстеразы крови — в течение не менее 4 месяцев (Goodman и Gilman, 1955), а восстановление активности холинэстеразы мозга и мышц происходит в течение не менее 3 месяцев (Koelle и Gilman, 1949). После действия ДФФ восстановление активности холинэстеразы идет почти исключительно за счет синтеза нового фермента. При введении фосфакола, тиофоса и других диэтиловых эфиров фосфорной и тиофосфорной кислот, а тем более при введении диметиловых эфиров тех же кислот (например, метафоса) восстановление активности холинэстеразы происходит быстрее (за счет частичного распада комплекса энзим-ингибитор).

Антихолинэстеразные вещества получают все более широкое распространение в медицине.

При введении антихолинэстеразных веществ в глаз они вызывают сужение зрачка и снижение внутриглазного давления. Вот почему эта группа веществ получила широкое применение в глазной практике при лечении

глаукомы. В офтальмологии применяются эзерин, ДФФ, фосфакол, армин (М. А. Алуф, 1955).

Антихолинэстеразные вещества, повышая тонус блуждающего нерва, увеличивают частоту и амплитуду сокращений кишечника, усиливают моторную деятельность желудка, стимулируют секрецию пищеварительных желез. Все эти качества способствовали тому, что ряд антихолинэстеразных веществ (эзерин, прозерин, ДФФ) нашел применение в клинике для борьбы с атонией кишечника, а также для предупреждения послеоперационной атонии мочевого пузыря.

Способность антихолинэстеразных веществ стабилизировать ацетилхолин и тем самым стимулировать сокращения матки было использовано в акушерской практике. Был предложен и разработан метод ускорения родов с помощью прозерина (М. Я. Михельсон, 1952; З. А. Дроздова, 1950; П. А. Белошапко и А. М. Фой, 1954).

Способность ингибиторов холинэстеразы потенцировать реакцию скелетных мышц на непрямое раздражение используется для лечения миастении. Для этой цели применяют эзерин, прозерин и иногда ДФФ.

Антихолинэстеразные вещества получили значительное распространение в восстановительной терапии заболеваний центральной нервной системы (Н. Н. Аносов и М. А. Розин, 1956).

Наконец, некоторые ингибиторы холинэстеразы используются в качестве стимуляторов работоспособности при сильном утомлении.

Антихолинэстеразные вещества широко используются в качестве инсектицидов. Значительный подъем сельского хозяйства и все увеличивающаяся из года в год программа производства сельскохозяйственных продуктов неразрывно связаны с применением в широких масштабах химических средств для борьбы с вредителями и болезнями растений.

К инсектицидам предъявляются два главных требования: а) высокая токсичность для вредных насекомых и б) безвредность для растений, сельскохозяйственных животных и человека. Таким образом, инсектициды должны обладать избирательной токсичностью.

К настоящему времени испытано в качестве инсектицидов очень большое количество органических производных фосфорной, тиофосфорной, пирофосфорной, тиопиро-

фосфорной и фосфиновых кислот. Среди фосфорорганических соединений было найдено много новых сильнодействующих инсектицидов. К положительным свойствам ФОС относятся их высокая токсичность, исключительная быстрота действия на вредителей и относительно малая стойкость в полевых условиях.

Одним из первых фосфорорганических инсектицидов контактно-кишечного действия можно считать тетраэтилпирофосфат (ТЭПФ), синтезированный в 1931 г. А. Е. и Б. А. Арбузовыми. Этот препарат в дальнейшем оказался высокоэффективным против различных видов вредителей растений. Однако ввиду его высокой токсичности для теплокровных и человека он не нашел применения в качестве инсектицида.

Синтезированный позже тиофос (НИУИФ-100) широко применяется в качестве инсектицида. Несколько лет назад был обнаружен препарат с избирательной токсичностью для колорадского картофельного жука — потазан (Е-838).

В Советском Союзе был широко испытан тетраэтилмонотиопирофосфат (пирофос, фосарбин), также впервые синтезированный А. Е. и Б. А. Арбузовыми в 1932 г. Препарат обладает сильным действием на ряд вредителей.

Находит применение и тетраэтилдитиопирофосфат (дитифос), который, однако, еще мало изучен в токсикологическом отношении.

Одним из основных недостатков всех перечисленных инсектицидов контактно-кишечного действия является их относительно высокая токсичность для человека и домашних животных.

Отравления возможны при проникновении веществ через дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт и даже через неповрежденную кожу. Разными авторами указываются смертельные дозы, установленные для различных видов теплокровных животных: пирофос — 0,6—2 мг/кг, тиофос — 4—20 мг/кг.

За последние годы синтезированы ФОС, обладающие сильными инсектицидными свойствами и малой токсичностью для теплокровных. К таким соединениям относятся карбофос (малатон), диазинон и др. Однако и эти ФОС подчас являются причиной отравлений (Walters, 1957).

Инсектициды «системного» (внутрирастительного) действия удобны и эффективны в борьбе со многими сосущими вредителями растений. Из инсектицидов этой группы наиболее изучены октаметил, меркаптофос и некоторые другие препараты.

Названные здесь ФОС не представляют всего класса инсектицидов. В последнее время синтезировано огромное число ФОС. Среди этих соединений обнаруживают все новые и новые инсектициды.

ФОС в настоящее время являются одной из наиболее распространенных групп инсектицидов. Все фосфорорганические инсектициды подвергаются тщательной токсикологической проверке, прежде чем их разрешат для широкого использования. Тем не менее при массовом применении фосфорорганических инсектицидов были отмечены случаи отравлений.

Антихолинэстеразные вещества используются также в качестве боевых отравляющих веществ. На всем протяжении второй мировой войны над человечеством висела угроза применения химического оружия со стороны фашистской Германии. В качестве новых средств химического нападения немецко-фашистские агрессоры намечали использовать фосфорорганические соединения. Два наиболее токсичных представителя этой группы отравляющих веществ, синтезированных в Германии во время второй мировой войны, описаны под названием «табун» и «зарин».

В основе биологического действия фосфорорганических боевых отравляющих веществ (БОВ) прежде всего лежит торможение холинэстеразы в холинергических синапсах.

Это ведет к прекращению гидролиза ацетилхолина, накоплению его в тканях в токсических концентрациях, которые и обусловливают все многообразие клинической картины отравления.

Кроме инактивации холинэстеразы, фосфорорганические БОВ могут действовать и непосредственно на холинорецепторы, а также на другие ферментативные системы (П. Н. Сафронов и Я. Р. Савинский, 1958; Ю. В. Другов, 1959; С. Н. Голиков и В. И. Розенгарт, 1960, 1964; O'Brien, 1960, 1964).

Отравления фосфорорганическими БОВ сопровождаются резкими нарушениями функций нервной системы

и приводят к длительной утрате трудо- и боеспособности, а при более высоких дозах — к смерти.

Сравнительно недавно опубликованы результаты первых попыток использования ФОС для лечения паразитарных заболеваний домашних животных и птиц.

ФОС широко используются и в промышленности. Например, уже давно эфиры фосфорной кислоты применяются в качестве пластификаторов для нитро- и ацетилклетчатки, понижающих воспламеняемость изделий из этих материалов. Эфиры дитиофосфорной кислоты нашли широкое применение в промышленности в качестве флотореагентов (флотореагенты применяются при обогащении металлических руд и некоторых других полезных ископаемых). За последние годы появились сведения, что некоторые ФОС могут быть использованы в качестве противоизносных присадок к смазочным маслам для уменьшения износа трущихся частей машин. В связи с этим перед промышленной токсикологией стоит задача выяснить, в какой мере промышленное использование таких ФОС, а в особенности промышленное производство фосфорорганических соединений является опасным для людей.

Таким образом, сфера применения антихолинэстеразных веществ (в частности, фосфорорганических соединений) непрерывно расширяется. Поскольку среди наиболее широко используемых ФОС нет веществ, абсолютно неядовитых для человека, необходимо внедрение в практику судебно-медицинской экспертизы методов прижизненной и посмертной диагностики отравлений этими веществами.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ ОБ ОТРАВЛЕНИИ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ

Случаи отравления людей фосфорорганическими соединениями встречаются довольно часто. В Японии ежегодно регистрируется от 1000 до 3000 случаев отравлений. Так, Ueda (1957) собрал данные о 7047 случаях отравлений фосфорорганическими инсектицидами, из которых в 1984 случаях наступил смертельный исход. В Болгарии из общего количества зарегистрированных в последние годы отравлений ядохимикатами работников сельского хозяйства 62% относятся к отравлениям ФОС (Kalojanova-Simeonova, 1962).

По данным А. Я. Якубова (1964), случаи отравления ФОС обычно происходят при авиационной наземной обработке хлопчатника, а также при транспортировке и хранении фосфорорганических инсектицидов. Кроме того, эти отравления наблюдались в результате употребления воды, загрязненной инсектицидами, у лиц, работавших на участках, подвергшихся опрыскиванию.

Некоторые авторы, разделяя все препараты по токсичности на 6 групп, к пятой и шестой группам (сверхтоксичных и чрезвычайно токсичных соединений) относят органические производные фосфора (фосфакол, октаметил, тиофос и др.). Естественно, что патология отравлений веществами этой группы интересует не только специалистов профпатологов и токсикологов, но и судебных медиков.

Пути поступления, судьба в организме, обезвреживание и выведение антихолинэстеразных веществ

Фосфорорганические соединения могут поступать в организм через желудочно-кишечный тракт, дыхательные пути и через неповрежденные кожу и слизистые оболочки.

Эзерин и, по-видимому, прозерин подвергаются в организме гидролитическому расщеплению, отчасти при посредстве холинэстеразы. В гидролизе ФОС (ДФФ, табун, фосфакол и др.) участвуют и другие ферменты. Антихолинэстеразные вещества выводятся из организма преимущественно в виде продуктов гидролиза (Goodman и Gilman, 1955).

Попадая в организм в очень малых количествах, ФОС способны вызывать тяжелые явления интоксикации, нередко заканчивающиеся смертью. При попадании в организм не только одной, но даже 2—3 смертельных доз почти весь оказавшийся в организме препарат расходуется на реакцию с холинэстеразой. В связи с этим попытки обнаружить в крови пострадавшего или в тканях трупа сохранивший активность яд, как правило, обречены на неуспех.

В некоторых случаях (чаще при суицидных попытках) в организм попадает сразу большое количество яда, подчас в десятки раз превышающее смертельные дозы. В таких случаях, если смерть пострадавшего наступила

быстро, можно надеяться обнаружить активный яд в органе, явившемся воротами поступления яда. Если очень большая доза яда всосалась в общий кровоток, то возможность обнаружить яд в неизмененном состоянии с течением времени уменьшается. В основе этого лежат два фактора. Во-первых, почти все ФОС в присутствии воды сравнительно быстро гидролизуются. Именно в таких условиях находится в организме непрореагировавший с холинэстеразой яд. Во-вторых, процессы гидролиза многих ФОС в организме катализируются особыми ферментами, получившими название фосфорилфосфатаз.

Формы отравлений антихолинэстеразными веществами

Как отмечалось выше, фосфорорганические соединения могут поступать в организм через желудочно-кишечный тракт, дыхательные пути и через неповрежденную кожу. Всасывание их через кожу происходит вследствие хорошей растворимости в жирах и липоидах и протекает бессимптомно, так как ФОС, как правило, не обладают местным раздражающим действием (за исключением карбофоса и октаметила). Отсутствие раздражающих свойств повышает опасность отравлений при попадании их на кожу. Нанесение на кожу ФОС вызывает отравление и гибель животных с такой же клинической картиной, какая наблюдается при других путях введения яда; удлиняются лишь сроки появления симптомов и гибели животных (Ю. И. Кундиев, 1962).

Мускариновый эффект (возбуждение М-холинорецепторов) выражается в виде чувства стеснения в груди, бронхоспазма, усиления бронхиальной секреции, потери аппетита, тошноты и рвоты, боли в желудке, гиперсаливации, усиленной потливости, слезотечения, бледности, брадикардии, миоза. Никотиновый эффект (возбуждение Н-холинорецепторов) выражается в мышечных фибриллярных подергиваниях, особенно век, языка, лицевых мышц, мышц шеи и наружных глазных мышц. В тяжелых случаях подергивания приобретают генерализованный характер. Центральные эффекты выражаются головными болями, нарушением сна, спутанностью сознания с дезориентацией, в тяжелых случаях наблюдаются чейн-стоксово дыхание, судороги, коматозное состояние (М. В. Гольдблатт и Ю. Гольдблатт, 1960).

Острые отравления антихолинэстеразными веществами по степени тяжести принято разделять на легкие, средней тяжести и тяжелые.

Легкая форма отравления. В первую очередь появляются симптомы перевозбуждения холинергических структур того органа (системы органов), который послужил «воротами» для яда: при попадании антихолинэстеразных веществ на глаза — миоз, при попадании на кожу — фибриллярные подергивания подлежащих мышц, при попадании в дыхательные пути — удушье вследствие спазма бронхиальной мускулатуры, при попадании в пищеварительный тракт — рвота, понос. Нередко эти явления сопровождаются головной болью, головокружением, бледностью, общей слабостью, повышенным слюнотечением и потоотделением, повышенной раздражительностью, сердцебиением. Сознание остается ясным. Симптомы интоксикации исчезают через 1—3 дня.

Отравление средней тяжести. При таких отравлениях, как правило, наблюдаются все симптомы, которые встречаются и при легкой форме отравления. Однако симптомы эти выражены значительно сильнее. Картина отравления никогда не ограничивается симптомами только со стороны какого-либо органа. Чаще всего доминирующим симптомом является бронхоспазм. Приступы удушья у отравленного напоминают тяжелый приступ бронхиальной астмы; они возобновляются через каждые 10—15 минут, но и в промежутках между ними дыхание сильно затруднено, выслушивается обилие сухих и влажных хрипов. Резко усиливается секреция слизистых оболочек дыхательных путей, слюнных, слезных и потовых желез. Появляются загрудинные боли, резкие боли в брюшной полости, рвота, понос (вследствие спастической, «отшнуровывающей», перистальтики желудка и кишечника). Наблюдаются фибриллярные подергивания произвольных мышц, в особенности жевательных.

Резко выражены миоз и спазм аккомодации. Зрение резко ослабевает, особенно при плохом освещении. Иногда отмечаются гиперемия и отечность сетчатки. В совокупности миоз, спазм аккомодации и отечность сетчатки иногда вызывают практически полную слепоту, исчезающую только через несколько дней. Сознание сохраняется, но чувство страха и раздражительность нарушают критическое восприятие окружающей обстановки.

Наблюдается озноб с последующим повышением температуры, снижение мышечного тонуса в нижних конечностях, понижение сухожильных рефлексов, положительный симптом Ромберга, неуверенная походка. Прощупывается увеличенная и болезненная печень.

При острых отравлениях средней тяжести активность холинэстеразы крови снижается на 60—70%. В поздние сроки отравления понижается содержание эритроцитов и гемоглобина в периферической крови, повышается содержание ретикулоцитов, уменьшается относительное содержание лимфоцитов, развивается незначительный нейтрофильный лейкоцитоз, артериальная и венозная гипоксемия. Большинство симптомов отравления исчезает через 4—5 дней.

Тяжелая форма отравления. Имеются все симптомы, характерные для легких и средней тяжести отравлений, но выражены они значительно более резко. Очень сильный спазм бронхиальной мускулатуры, сочетающийся с повышенной секрецией желез слизистых оболочек дыхательных путей, быстро приводит к кислородному голоданию. Иногда кислородное голодание усугубляется развитием острого отека легких. В части случаев отравления антихолинэстеразными веществами асфиксия вследствие спазма бронхов и скопления в них большого количества секрета является непосредственной причиной смерти. Однако не исключена возможность прямого угнетающего влияния антихолинэстеразных веществ на дыхательный центр, приводящего к его параличу (De Candole и др., 1953).

Одним из доминирующих симптомов являются клонико-тонические судороги. Начавшись с подергиваний отдельных мышечных групп, они очень быстро принимают характер генерализованных судорожных приступов. Каждый приступ длится не менее 2 минут, интервалы между приступами — от нескольких секунд до часа и более. Во время судорог сознание у пострадавшего отсутствует. Оценка характера судорог может иметь прогностическое значение. Прогноз более благоприятен, если кратковременные периоды судорог возникают у пострадавшего с большими (1 час и более) интервалами. Интервалы между приступами могут быть резко укорочены или вообще отсутствовать. У таких пострадавших бурные клонико-тонические судороги сменяются тетаниче-

скими. В дальнейшем развивается блок нервно-мышечного проведения, и больной быстро гибнет от курареподобного паралича дыхательных мышц. Фасцикуляции скелетных мышц продолжаются в течение 20—40 минут и более после наступления клинической смерти.

Хронические отравления характерны лишь для действия фосфорорганических соединений, так как только они необратимо инактивируют холинэстеразу. Если восстановление активности холинэстеразы (за счет синтеза новой и за счет спонтанной реактивации ингибированной) протекает медленнее, чем инактивирование ее вновь поступающими в организм порциями ФОС, то создаются условия для возникновения хронического отравления. При этом прогрессивно снижается активность холинэстеразы и усиливаются симптомы возбуждения холинергических структур. Наиболее характерны для хронического отравления антихолинэстеразными веществами повышенная потливость, гиперсаливация, нарушения функции желудочно-кишечного тракта. Наиболее сильно беспокоят больных центральные явления: раздражительность, эмоциональная неустойчивость, галлюцинации, нарушения сна, ночные кошмары (Grob и др., 1947, 1963).

Для действия некоторых веществ (диизопропилфторфосфата, триортокрезилфосфата) характерны появление прогрессирующей мышечной слабости и развитие спастических параличей (К. В. Цомая, 1957, и др.).

При хроническом отравлении некоторыми ФОС (ТОКФ, ДФФ, мипафокс, изопестокс) наблюдаются своеобразные расстройства функции нервной системы, выражающиеся главным образом в стойких невритах, парезах и параличах конечностей. Отравления этими веществами сопровождаются демиелинизацией нервов, перерождением клеток передних рогов, а также жировой дегенерацией белого вещества спинного мозга. Отсюда ТОКФ называют «миелиновым ядом».

Морфологические изменения при отравлениях антихолинэстеразными веществами

Инактивация холинэстеразы — процесс субмикроскопический. Поэтому морфологических изменений, которые были бы специфичны только для отравлений ан-

тихолинэстеразными веществами, не существует. Если отравление быстро привело к смерти, патогистологических изменений в органах и тканях обнаружить не удается. Наблюдаются лишь отек мозга, выраженное полнокровие легких, миокарда, печени, почек, селезенки (Е. И. Спыну, 1957).

Наиболее полное описание морфологических изменений, наблюдаемых при отравлении ФОС, дает С. С Вайль (1958). Это описание приведено автором на примере действия нескольких ФОС, которые могут быть использованы в качестве БОВ. Однако механизм токсического действия фосфорорганических инсектицидов и лекарств принципиально не отличается от механизма действия фосфорорганических БОВ. Поэтому фактический материал, суммированный в книге С. С. Вайля, может быть с успехом использован для изучения патологической анатомии отравлений практически любыми антихолинэстеразными веществами. Обстоятельная характеристика патоморфологических изменений при отравлении фосфорорганическими инсектицидами изложена в монографиях Ю. С. Кагана (1963) и Е. И. Маковской (1967).

Быстрая смерть отравленного после ряда бурных судорожных приступов обусловливает сравнительно быстрое появление и значительную выраженность трупного окоченения. Миоз обычно сохраняется на трупе и может иметь значение как дифференциально-диагностический признак, облегчающий распознавание отравления. Однако в клинике миоз встречается не во всех случаях отравлений антихолинэстеразными веществами. Следовательно, и при обследовании трупа отравленного диагностическое значение может иметь только наличие миоза, а его отсутствие не позволяет уверенно отвергнуть отравление антихолинэстеразным веществом как причину смерти. Важное дифференциально-диагностическое значение имеет обнаружение спастических сокращений гладких мышц кишечника и бронхов.

Может быть цианоз кожных покровов. Изо рта и носа выделяется слизь. Микроскопически отмечаются признаки спастических сокращений мускулатуры мелких бронхов: просветы их сужены, слизистая собрана в виде складок. Легкие полнокровны, иногда отечны, с участками ателектаза. Под плеврой и в паренхиме легких встречаются мелкие кровоизлияния, иногда сливающиеся

между собой. При наступлении смерти через несколько дней после развития отравления могут наблюдаться симптомы мелкоочаговой пневмонии.

Полости сердца (особенно правые) несколько расширены и содержат преимущественно жидкую кровь. Под эпикардом и эндокардом обнаруживают мелкоточечные кровоизлияния, а иногда и кровоизлияния в толщу миокарда. Сравнительно быстро развиваются дистрофические изменения мышечных волокон (исчезновение поперечной исчерченности и т. п.). В некоторых случаях наблюдается картина так называемого гиалинового некроза волокон. Наряду с белковой дистрофией отмечается пылевидное и мелкокапельное ожирение миокарда. Ю. С. Каган и Е. И. Маковская (1960) при отравлении животных некоторыми ФОС наблюдали мутное набухание мышечных волокон миокарда и (более редко) мелко- и крупноочаговые скопления гистиоцитов и клеток лимфоидного типа.

Слизистые оболочки желудка и кишечника полнокровны, с мелкими кровоизлияниями по верхушкам складок. По ходу кишечных петель видны участки спастического сокращения мускулатуры кишечной стенки, придающие кишечнику вид четок. Гистологически определяются так называемые волны сокращения мышечной оболочки.

Ткань печени полнокровна, с мелкоточечными кровоизлияниями под капсулой. Гистологически определяются мелко- и крупнокапельное ожирение печеночных клеток, отдельные фокусы диссоциации печеночных балок, множественные мелкие участки некроза. Ю. С. Каган и Е. И. Маковская (1960) в некоторых случаях экспериментальных отравлений отмечали расширение пространств Диссе, в которых накапливалась бледно окрашивающаяся эозином жидкость.

В поджелудочной железе при экспериментальном отравлении собак были обнаружены множественные кровоизлияния, иногда сливающиеся в крупные фокусы.

Ткань почек полнокровна, с мелкоточечными кровоизлияниями под капсулой. Просветы извитых канальцев расширены и заполнены эозинофильными белковыми массами в виде глыбок (Ю. С. Каган и Е. И. Маковская, 1960). В эпителии извитых канальцев — выраженная картина белковой дистрофии и мелкокапельного ожирения.

Селезенка иногда полнокровна, иногда малокровна. В подостром периоде в ретикуло-эндотелии могут отлагаться глыбки гемосидерина.

Выраженные морфологические изменения наблюдаются в центральной нервной системе, особенно если смерть наступила через несколько часов после отравления (С. С. Вайль, 1958; Ю. С. Каган и Е. И. Маковская, 1957, 1960; Ю. С. Каган, 1963). Отмечаются небольшое полнокровие мягкой мозговой оболочки и умеренный отек ее. Сосуды головного мозга расширены, стенки их разрыхлены и отечны, в мелких сосудах наблюдаются набухание и отторжение клеток эндотелия. Имеются точечные кровоизлияния в коре головного мозга, подкорковых узлах, стволовой части и в мозжечке. Кровоизлияния носят выраженный периваскулярный характер. Они возникают как вследствие разрыва стенок сосудов, так и путем диапедеза. Нередко наблюдается перицеллюлярный отек и дистрофические изменения головного и спинного мозга.

В некоторых нервных клетках протоплазма и ядро набухают, иногда появляется вакуолизация, исчезает зернистость протоплазмы. В других клетках отмечаются явления пикноза: они сморщиваются, при импрегнации обнаруживают усиленную аргентофилию. Иногда отростки нервных клеток неравномерно утолщаются вследствие веретенообразных вздутий по их ходу и заканчиваются булавовидными утолщениями.

Однако смерть при отравлении антихолинэстеразными веществами (в том числе ФОС) может наступить так быстро, что морфологически выявляемые поражения ганглиозных клеток головного мозга не успевают развиться.

При гистологическом исследовании органов и тканей животных, отравленных ФОС, мы (Я. С. Смусин, 1963) обратили внимание на изменения центральной нервной системы и прежде всего головного мозга. Эти изменения состояли в том, что в коре головного мозга и в подкорковых узлах отмечалось полнокровие с расширением и переполнением кровью капилляров, мелких вен и артерий. Нередко встречались небольшие кровоизлияния, локализующиеся преимущественно вокруг сосудов. Эти экстравазаты встречались наиболее часто в среднем и продолговатом мозгу, а также в белом веществе мозжечка.

В некоторых случаях отмечалась отечность субэпендимарного слоя. Довольно часто наблюдались явления перицеллюлярного отека: отечная жидкость раздвигала элементы глии, окружала ганглиозные клетки. Особенно четко перицеллярный отек был выражен в спинном и продолговатом мозгу и на уровне подкорковых узлов среднего мозга.

Как правило, со стороны мягкой мозговой оболочки отмечались расширенные и переполненные кровью сосуды и даже кровоизлияния под эпендимой (рис. 1).

Окраска срезов центральной нервной системы по Нисслю не дает возможности установить каких-либо грубых морфологических изменений. Лишь в некоторых случаях выявлялись дистрофические изменения нервных клеток в различных участках центральной нервной системы: в коре полушарий, подкорковых узлах, среднем мозгу, аммоновом роге, спинном мозгу. Иногда наблюдалась гиперхромность протоплазмы, ее базофилия, неравномерное распределение нисслевской зернистости, местами ее распыление. Изредка встречались крупные безъядерные клетки с распыленным тигроидом.

В ганглиозных клетках передних, задних и боковых рогов спинного мозга встречались умеренно выраженные дистрофические изменения: в одних нервных клетках были видны явления набухания протоплазмы и ядер, исчезновение зернистости протоплазмы, другие клетки становились пикнотичными, сморщенными.

При гистологическом исследовании миокарда отмечались расширение и переполнение кровью сосудов межуточной ткани, иногда с кровоизлияниями вокруг них (рис. 2). Мелкие экстравазаты определялись и в толще миокарда. В ряде случаев были выражены дистрофические явления мышечных волокон: при окраске срезов по Гейденгайну были обнаружены группы мышечных волокон с утраченной поперечной исчерченностью, протоплазма их выглядела уплотненной, базофильной, гомогенизированной, т. е. наблюдалась картина так называемого гиалинового некроза волокон (рис. 3). Эти дистрофические поражения имели мозаичный, очаговый характер.

Со стороны печени и почек отмечались явления полнокровия, встречались и единичные мелкие экстравазаты.

Наиболее четкие изменения наблюдались в легочной ткани. Ткань представлялась повышенно воздушной, на

Рис. 1. Головной мозг кошки. Обширное кровоизлияние под эпендимой бокового желудочка. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 5, об. 8.

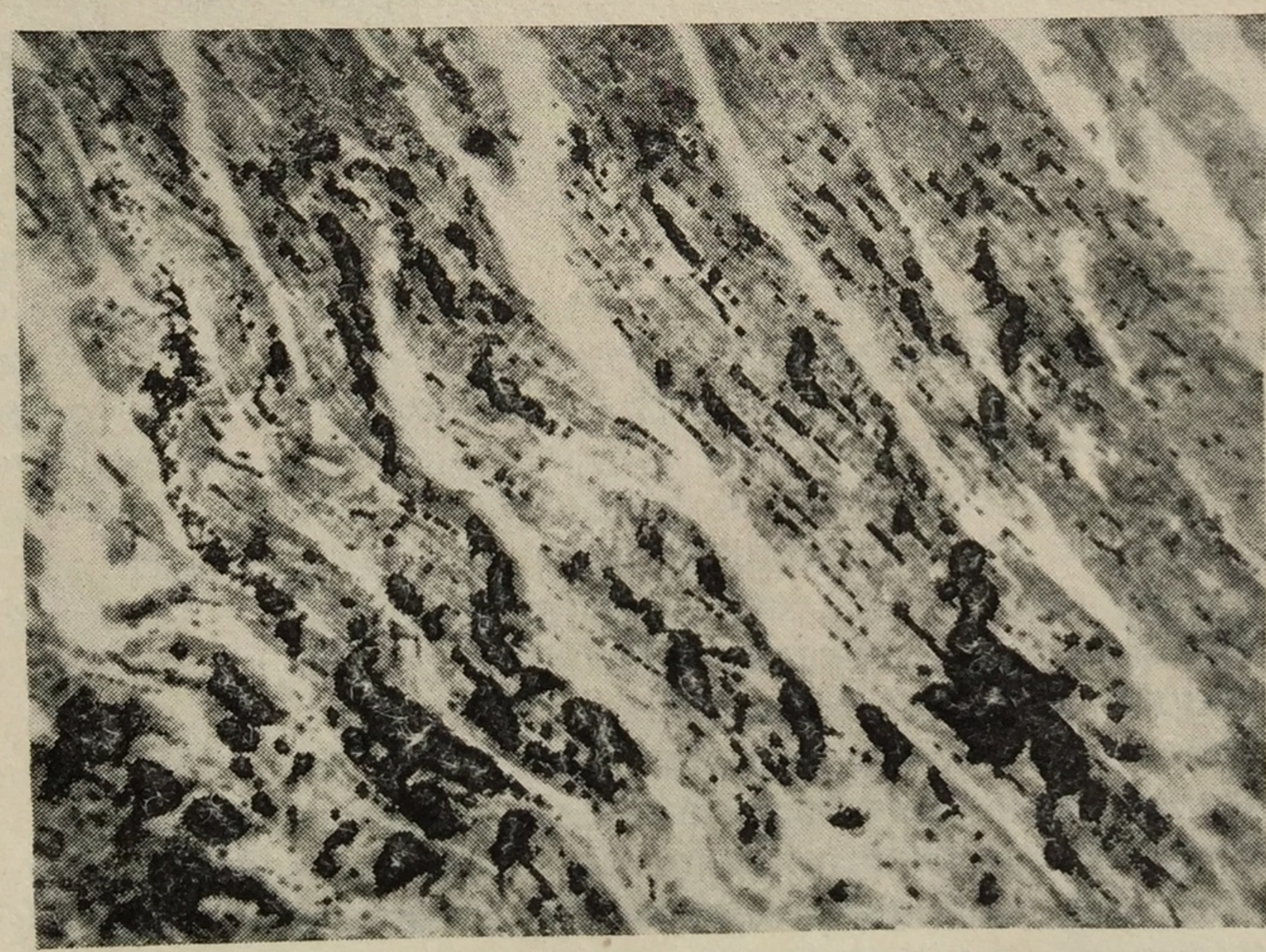


Рис. 2. Сердце кошки. Полнокровие сосудов и мелкие кровоизлияния. Окраска по Гейденгайну. Ок. 5, об. 20.

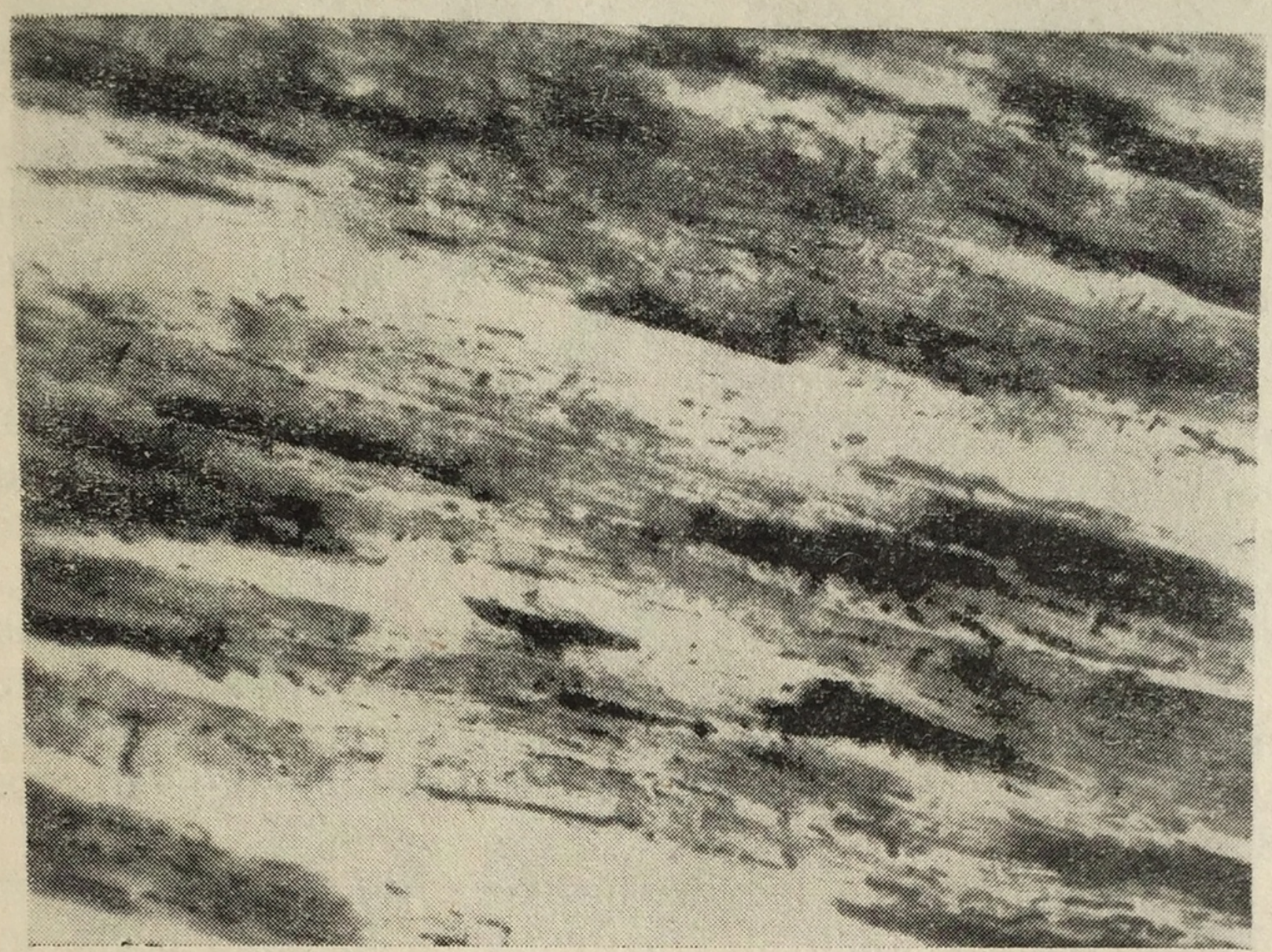


Рис. 3. Сердце кошки. Гомогенизация («гиалиновый некроз») мышечных волокон. Окраска по Гейденгайну. Ок. 5, об. 20.

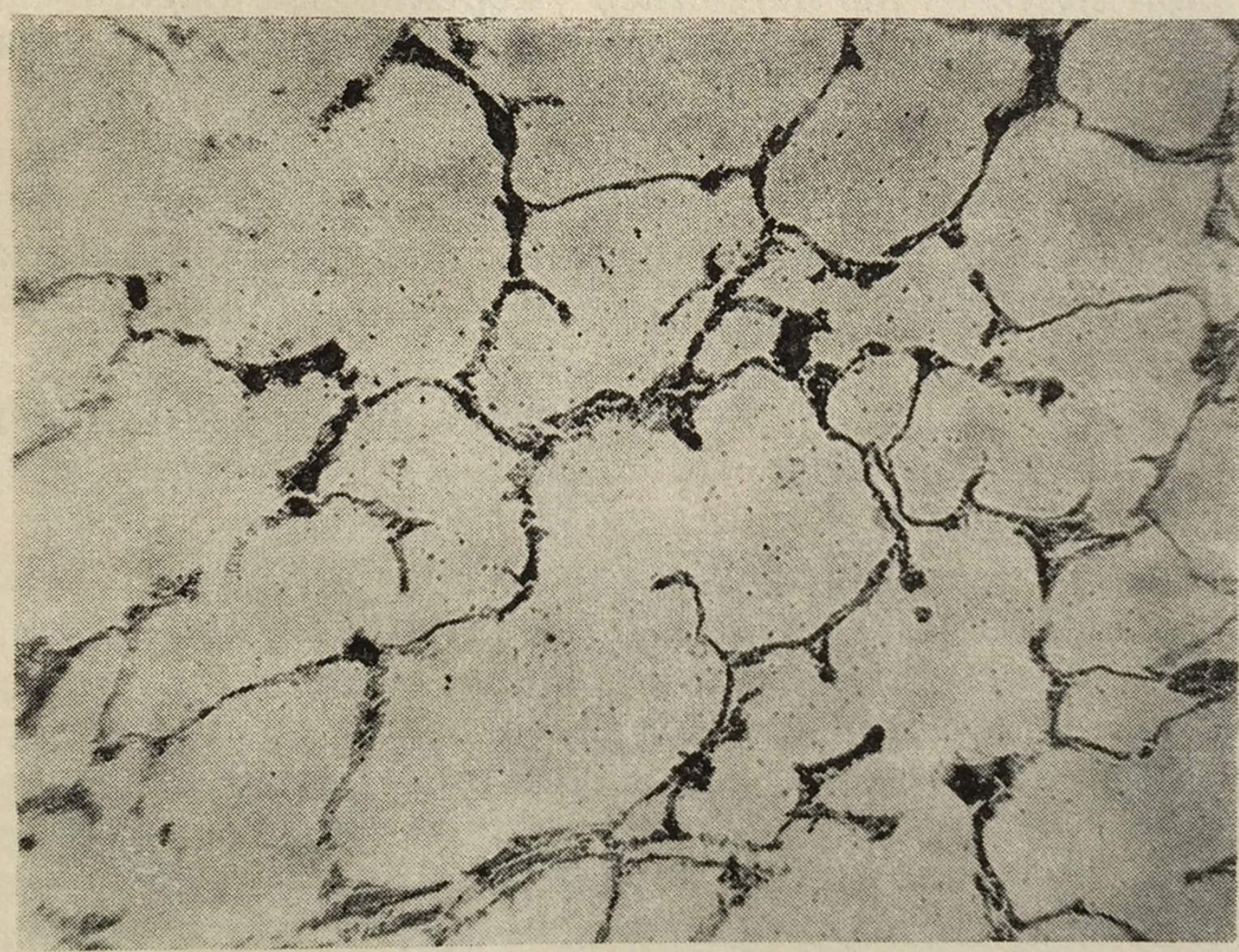


Рис. 4. Легкое кошки. Участок эмфиземы. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 5, об. 8.

значительном протяжении стенки альвеол истончены, местами разорваны, образуют большие воздухоносные полости (рис. 4); иногда капилляры расширены, местами просвет альвеол выполнен эритроцитами. Участки эмфиземы порой чередуются с фокусами ателектаза (рис. 5).

Изменения со стороны бронхов выражались в набухании слизистой оболочки мелких и более крупных бронхов; слизистая собрана в виде продольно расположенных складок. На поперечных срезах просвет мелких бронхов резко сужен, имеет звездчатую форму (рис. 6). Иногда такие спазмированные бронхи выполнены эритроцитами.

В поперечнополосатых мышцах при окраске срезов гематоксилин-эозином в отдельных случаях были видны базофильные волокна с гомогенизированной протоплазмой.

Таким образом, при гистологическом исследовании органов и тканей животных отмечались прежде всего изменения в легких в виде явлений выраженного бронхоспазма, сопровождавшиеся эмфиземой и очаговым ателектазом легочной ткани. Со стороны центральной нервной системы наблюдались умеренно выраженные дистрофические изменения нервных клеток и перицеллярный отек.

Кроме того, в центральной нервной системе и во внутренних органах можно было отметить сосудистые расстройства в виде расширения и переполнения кровью капилляров и мелких сосудов с кровоизлияниями вокруг них.

Таким образом, достаточно специфичных патоморфологических симптомов отравления антихолинэстеразными веществами нет.

Можно согласиться с мнением Ю. С. Кагана (1963), что дозы фосфорорганических инсектицидов, не вызывающие видимых признаков отравления, но понижающие активность холинэстеразы, ведут к возникновению обратимых морфологических изменений в отдельных нервных клетках или группах клеток головного мозга и внутренних органов (набухание нервных клеток, эктопия ядер, хроматолиз, паренхиматозная дистрофия клеток печени, миокарда, желез внутренней секреции, венозное полнокровие). При отравлении этими ядами прежде всего возникают гемодинамические нарушения, дистрофические

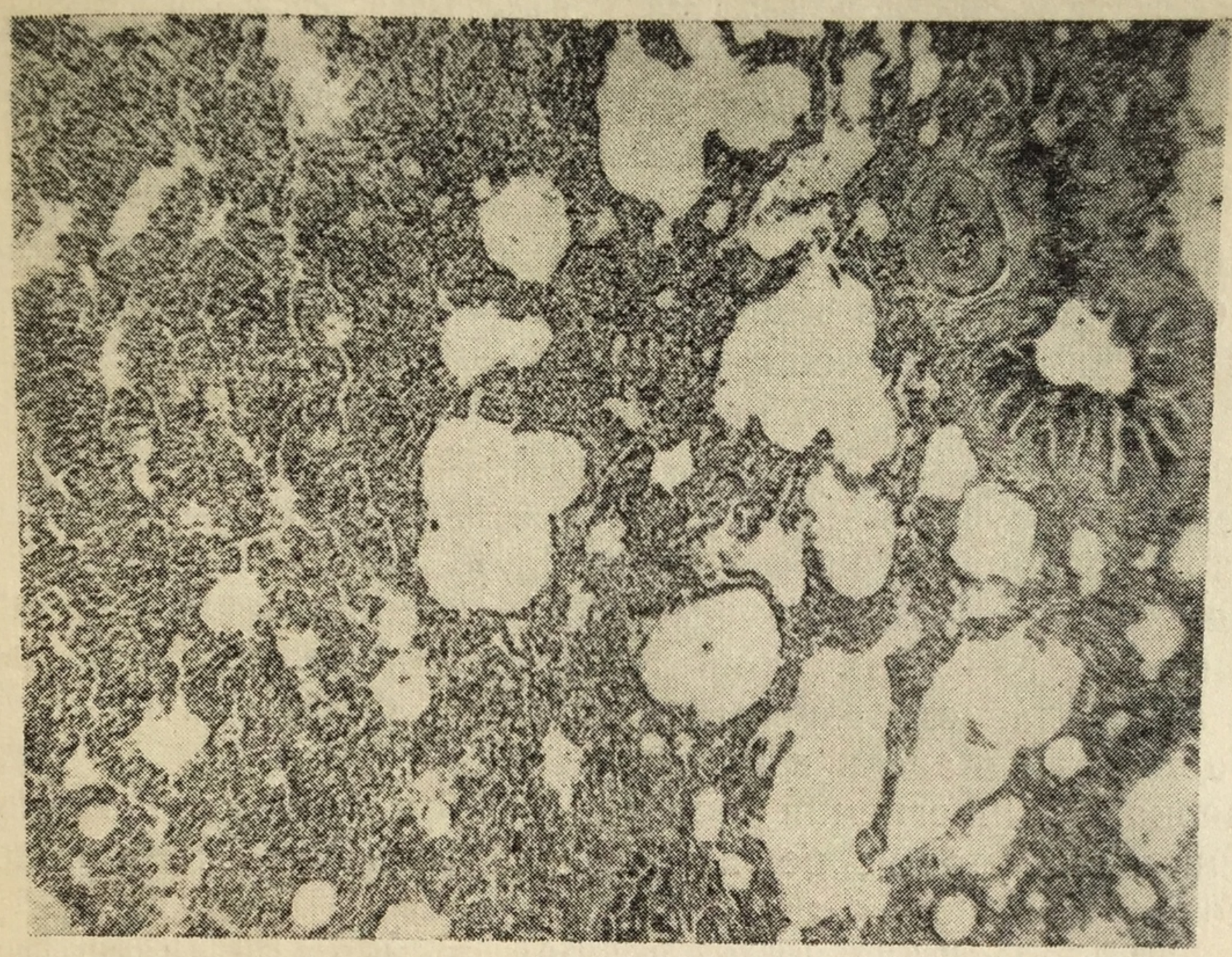


Рис. 5. Легкое кошки. Ателектаз и эмфизема легких. Видны два участка бронхоспазма. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 5, об. 8

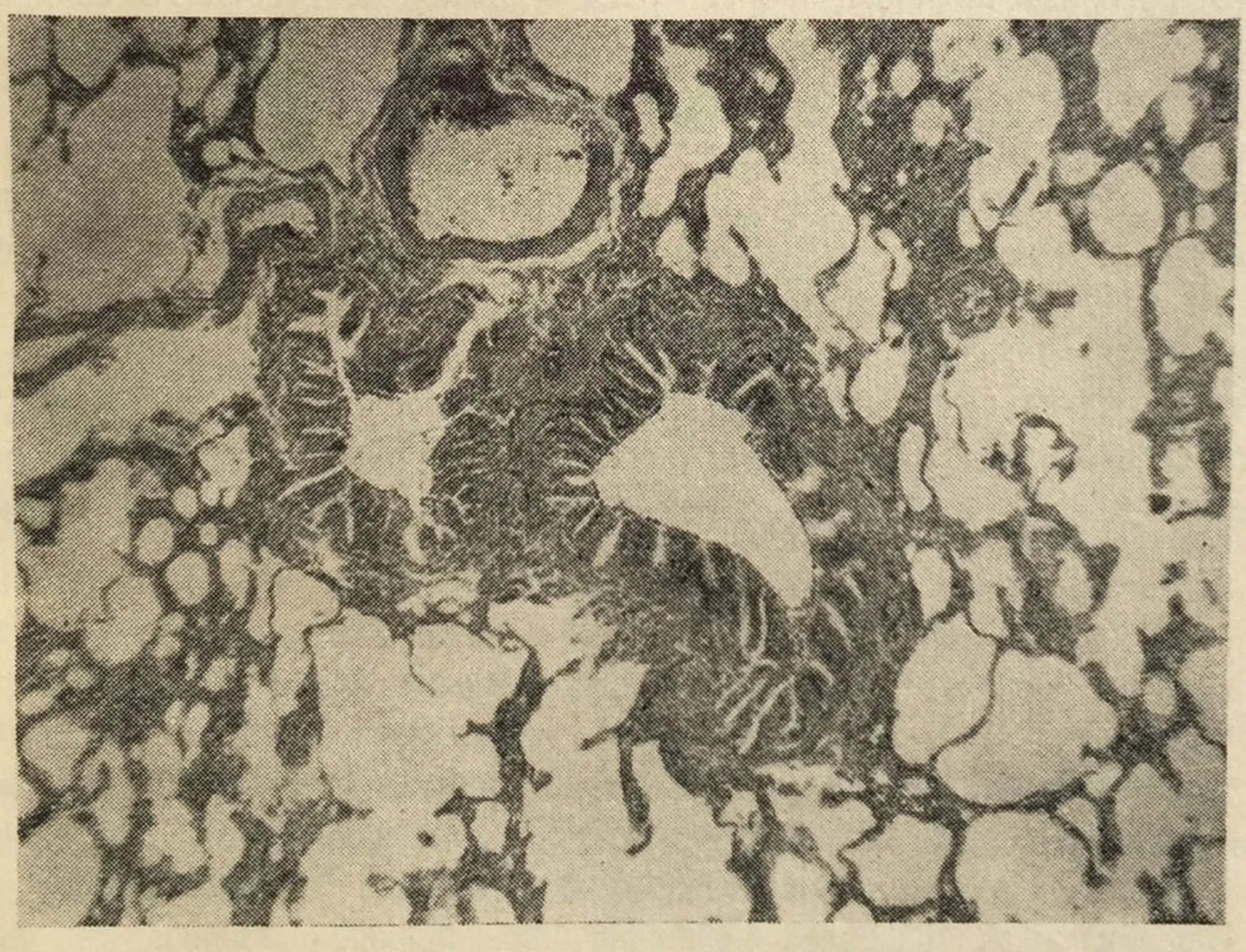


Рис. 6. Легкое кошки. Спазм мускулатуры бронхов, набухание эпителия. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 5, об. 8,

изменения в нервных клетках головного мозга (преимущественно коры и подкорковых ядер), а также угнетение и разжижение основного аргирофильного вещества.

Обнаруженные у животных морфологические изменения не являются специфическими для действия ФОС и обусловлены, по-видимому, не только изменением ацетилхолинового обмена, но и нарушениями других видов обмена веществ и гипоксией, что особенно характерно при введении токсических и смертельных доз. Вместе с тем В. В. Русских (1962) считает, что в морфологической картине энцефалопатии, вызванной ФОС, наряду с изменениями общетоксического характера имеются специфические изменения синаптического аппарата, связанные с антихолинэстеразными свойствами ФОС (уменьшение размеров синапсов в клетках спинного мозга и их чрезмерная импрегнация солями серебра, деформирование синапсов, утолщение и распад пресинаптических волокон).

Наиболее надежным способом посмертной диагностики отравлений антихолинэстеразными веществами являются специальные исследования, в ходе которых обычно удается не только обнаружить снижение активности холинэстеразы тканей, но и количественно оценить степень такого снижения.

Многочисленные наблюдения свидетельствуют, что еще до развития клинических симптомов интоксикации активность холинэстеразы понижается. Отсюда этот показатель является наиболее ранним симптомом воздействия ФОС на организм. Выраженные явления отравления обычно возникают, когда активность холинэстеразы эритроцитов (истинный фермент) снижается на 50—70%, хотя отдельные симптомы отравления наблюдаются и при менее значительном снижении холинэстеразной активности.

Глава II

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Прямых методов количественного определения содержания холинэстеразы в ткани не существует. Все имеющиеся методы являются косвенными. Тем или иным путем оценивается скорость гидролиза одного из субстратов холинэстеразы в присутствии определенной порции ткани. Скорость гидролиза субстрата является мерилом активности (содержания в ткани) холинэстеразы.

Для определения активности холинэстеразы имеются две принципиально различающиеся группы методов. Одна из них основана на определении скорости убывания концентрации ацетилхолина, добавленного в пробу. В другой группе используют для оценки активности фермента скорость увеличения концентрации в пробе продуктов гидролиза ацетилхолина (обычно оценивают скорость увеличения концентрации уксусной кислоты). Гистохимические исследования основаны на выявлении аминоспиртового остатка молекулы субстрата (тиохолина).

Таким образом, первая группа методов сводится к определению концентрации ацетилхолина в растворе после его инкубации с холинэстеразой или во время инкубации (Scheiner, 1939). Такие определения можно проводить либо биологическими, либо биохимическими способами.

К жидкости, содержащей фермент, прибавляют известное количество ацетилхолина. В создаваемых оптимальных условиях (температура, соотношение концентраций субстрата и фермента, pH среды) ферментативный гидролиз ацетилхолина идет с постоянной скоростью. Через определенный промежуток времени гидролиз ацетилхолина останавливается добавлением трихлоруксусной кислоты или прозерина, инактивирующих фермент. Количество оставшегося неразрушенным ацетилхолина определяют путем тестирования на различных биологических объектах (например, прямая мышца живота лягушки или спинная мышца пиявки). Такой способ впервые предложили Loevi и Navratil в 1926 г. В дальнейшем

Plattner и Galehr (1928) подробно разработали этот метод. Различные модификации данного метода описаны в работах многих авторов.

Количество ацетилхолина, оставшегося неразрушенным после контакта с холинэстеразой, можно определить и биохимическим способом (Hestrin, 1949), получившим широкое распространение.

Рост концентрации продуктов гидролиза ацетилхолина как показатель активности холинэстеразы можно оценить только биохимически. Количество выделяющейся уксусной кислоты определяется либо по сдвигу pH среды за единицу времени (прямая потенциометрия или изменение окраски специально добавленного в пробу индикатора), либо титрованием — по количеству щелочи, которое необходимо добавлять в пробу, чтобы нейтрализовать выделяющуюся кислоту. Удобным и точным является газометрическое определение в аппарате Варбурга, при котором гидролиз ацетилхолина идет в буферном растворе, насыщенном угольной кислотой. Объем выделяющейся из раствора CO_2 соответствует количеству уксусной кислоты, образовавшемуся в ходе реакции (Ammon, 1933).

Биохимические способы определения активности холинэстеразы многократно модифицировались (П. И. Борисов и В. И. Розенгарт, 1950; А. А. Покровский, 1950, 1960, и др.). Имеется ряд микрохимических методов определения активности холинэстеразы (С. Р. Зубкова и Т. В. Правдич-Неминская, 1945, и др.).

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Для определения активности холинэстеразы биологическим методом мы использовали модификацию, описанную М. Я. Михельсоном (1948).

Прежде чем дать описание самого метода определения активности холинэстеразы, нужно остановиться на технике приготовления гомогенатов (например, головного мозга) для определения в них активности холинэстеразы. Животное, например белую мышь, забивают быстрым отрезанием головы. Затем с черепа срезают кожу. С помощью ножниц и пинцета вскрывают череп и выталкивают весь головной мозг. При этом обрываются черепномозговые нервы.

Ввиду того что содержание холинэстеразы в головном и спинном мозгу может быть неодинаковым, следует отделять головной мозг от спинного всегда на одном и том же уровне, а именно по каудальному углу дна IV желудочка. Затем нужно снять с головного мозга мягкую мозговую оболочку.

Предположим, что мозг весит 0,46 г. Помещаем мозг в фарфоровую чашку и с помощью ступки энергично, но равномерно растираем его, постепенно добавляя к гомогенату дистиллированную воду. Если мы хотим приготовить гомогенат в разведении 1:8, то общий объем взвеси должен составить $0{,}46 \times 8 = 3{,}68$ мл. Из этого объема 0,46 мл приходится на объем головного мозга. Следовательно, нужно добавить $3{,}68 - 0{,}46 = 3{,}22$ мл воды. При определении активности гомогената нужно следить за тем, чтобы во все пробы попала взвесь одинаковой густоты.

Активность холинэстеразы мало меняется при хранении. Мы хранили при температуре 2—4° как готовый гомогенат, так и кусочки ткани, но не допускали при этом высыхания, помещая гомогенат или ткань в бюкс с хорошо притертой крышкой.

Гомогенаты из других тканей готовят таким же путем, но для приготовления гомогенатов из других тканей (например, мышечной) приходится при растирании добавлять незначительное количество кварцевого песка.

При растирании ткани мы использовали приспособленную для этой цели настольную электродрель. Определение активности холинэстеразы производили в водяном термостате при температуре 38°. Постоянство температуры регулировали с помощью ртутно-контактного термометра.

В пенициллиновые флаконы, погруженные в воду термостата, последовательно приливали: дистиллированной воды 2,5 мл, препарата холинэстеразы (например, гомогената головного мозга белой мыши 1:8) 0,5 мл. Через 10 минут, когда устанавливалось температурное равновесие, к содержимому флакона добавляли раствор ацетилхолина $1 : 10^{-3}$ 1 мл (предварительно погруженный в воду термостата).

С момента приливания ацетилхолина к гомогенату начинался гидролиз субстрата. Через определенное время, например 120 секунд после приливания ацетилхолина,

для остановки дальнейшего гидролиза к флаконам приливали 15% раствор трихлоруксусной кислоты 1 мл.

За несколько секунд до приливания ацетилхолина начинали энергично встряхивать флаконы для перемешивания их содержимого. Встряхивание продолжали с одинаковой интенсивностью, пока ацетилхолин соприкасался с холинэстеразой, и прекращали после добавления кислоты.

Трихлоруксусная кислота, осаждая и денатурируя белки, в том числе и холинэстеразу, и резко повышая кислотность среды, мгновенно прекращает дальнейший гидролиз ацетилхолина.

После фильтрования и соответствующего разведения количество оставшегося неразрушенным ацетилхолина тестировали на прямой мышце живота лягушки. Этот объект можно использовать даже без эзеринизации, что в значительной мере ускоряет определения.

Разрушив препаровочной иглой центральную нервную систему лягушки и тем самым обездвижив ее, мы укрепляли лягушку к пробковой доске вентральной поверхностью вверх. Затем срезали кожу со всей поверхности груди и живота. Далее делали разрез по латеральным краям прямых мышц живота, накладывали лигатуры на краниальный и каудальный концы мышц, перерезали тело грудной кости выше лигатуры, а сухожилия каудального конца ниже лигатуры.

Полученный препарат состоял, таким образом, из двух прямых мышц: он сильнее и выносливее одиночной мышцы и готовить его значительно проще.

Препарат сразу же переносят в ванночку установки, как это изображено на рис. 7. Петлю каудальной лигатуры надевают на крючок, а краниальную лигатуру соединяют с плечом рычажка.

Ванночка для мышц обычно имела объем 10 мл. Следует следить за тем, чтобы жидкость полностью покрывала всю мышцу и она могла свободно сокращаться, не соприкасаясь со стенками ванночки или трубки (для аэрации).

Высоту сокращения мы регистрировали визуально с помощью рычажка Энгельмана по миллиметровой шкале. Движение рычажка перед бумагой происходило свободно, но так, чтобы рычажок не соприкасался с бумагой.

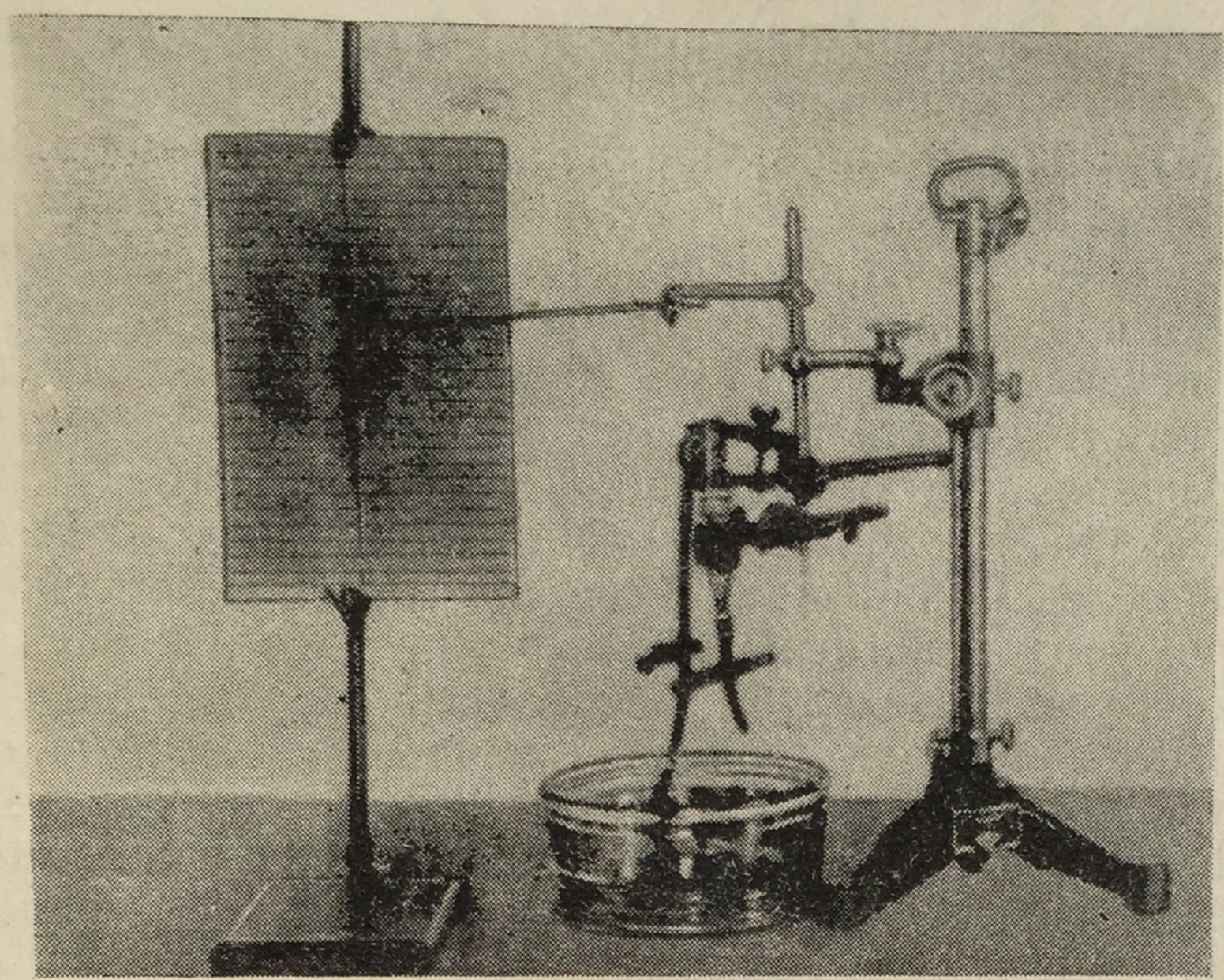


Рис. 7. Общий вид установки для определения ацетилхолина, оставшегося неразрушенным после контакта с холинэстеразой.

При соотношении плеч рычажка 1:10 подбирали такое отягощение, чтобы ацетилхолин в концентрации 1.10^{-6} вызывал на неэзеринизированной мышце сокращение высотой от 60 до 100 мм.

Раствор Рингера для мышцы мы готовили по обычному рецепту: 6 г хлористого натрия, 0,1 г хлористого кальция, 0,075 г хлористого калия, 0,1 г двууглекислой соды и доливали дистиллированной воды до метки 1000.

Через раствор, заполняющий ванночку, продували комнатный воздух с помощью двух сообщающихся сосудов. Аэрацию производили через маленькое отверстие в конце капиллярного крючка, к которому прикрепляли лигатуру от краниального конца подвешенной мышцы. Мы следили за тем, чтобы темп аэрации всегда был постоянным, так как чувствительность мышцы сильно зависит от аэрации. После укрепления мышцы в установку мы включали аэрацию, и в течение 30—60 минут мышца свободно висела. При этом неоднократно меняли раствор Рингера, чтобы полностью отмыть кровь и другие растворимые в воде вещества.

Высота сокращения мышцы регистрировалась через 120 секунд после приливания ацетилхолина. Затем следовало 4-кратное промывание рингеровским раствором в течение 2 минут с последующей паузой в 6 минут.

Сравнение контрольного раствора (К) с исследуемым (1) мы производили в последовательности К, 1, 1, К. Такая последовательность уменьшает влияние колебаний в чувствительности препарата на точность определений.

Имеется прямая пропорциональная зависимость между величиной сокращения мышцы и концентрацией ацетилхолина. В наличии подобной пропорциональности можно убедиться, испытывая ацетилхолин в концентрациях, вызывающих субмаксимальные сокращения мышцы. Для неэзеринизированной мышцы это обычно концентрация в пределах $1 \cdot 10^{-7}$—$1 \cdot 10^{-6}$. Работая в этом диапазоне, можно высчитать концентрацию ацетилхолина в исследуемом растворе уже после первого определения.

Допустим, контрольный раствор ацетилхолина (К) в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ вызывает сокращения мышцы высотой 80 мм, а исследуемый раствор (1) — высотой 22 мм, тогда концентрация ацетилхолина в исследуемом растворе будет равна $\frac{1 \cdot 10^{-6}}{80} = \frac{X}{22}$; $X = 2{,}75 \cdot 10^{-7}$.

Для проверки этого результата можно испытать действие контрольного раствора ацетилхолина в концентрации $2{,}75 \cdot 10^{-7}$. Высота сокращения должна быть 22 мм (рис. 8).

Не всегда наблюдается строгая пропорциональность между концентрацией ацетилхолина и высотой сокращения. В этих случаях необходимо прежде всего определить высоту сокращения мышцы при различных концентрациях контрольного раствора ацетилхолина: $1 \cdot 10^{-6}$; $7{,}5 \cdot 10^{-7}$; $5 \cdot 10^{-7}$ и т. д. Затем, начертив на миллиметровой бумаге систему координат, нужно отложить на оси абсцисс величины концентраций, а на оси ординат — соответствующие им высоты сокращений и провести кривую, показывающую зависимость высоты сокращения мышцы от концентрации ацетилхолина. Путем графической интерполяции можно установить, какой концентрации ацетилхолина соответствует высота сокращения при действии исследуемого раствора (1). Предположим, что эта высота соответствует концентрации ацетилхолина

$4 \cdot 10^{-7}$. Для проверки правильности предыдущего расчета нужно испытать действие контрольного раствора ацетилхолина (К) в концентрации $4 \cdot 10^{-7}$. Он должен дать высоту сокращения, соответствующую исследуемому раствору (1).

Приведенные способы определения служат для того, чтобы найти концентрацию контрольного раствора ацетилхолина (К), в которой он вызывает такое же сокра-

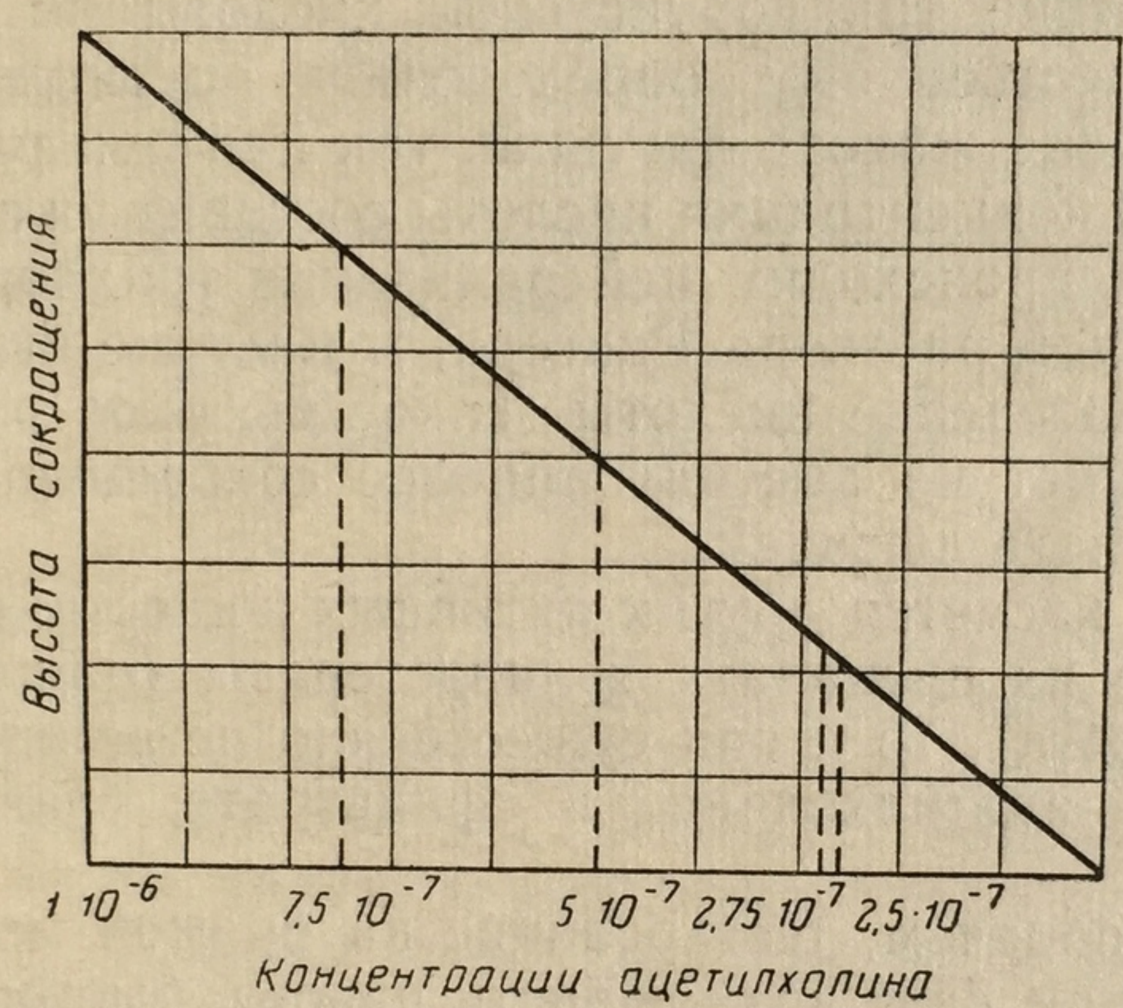


Рис. 8. Зависимость между величиной сокращения мышцы и концентрацией ацетилхолина (объяснение см. в тексте).

щение, как и исследуемый раствор (1) в данном разведении. Обычно мы подбирали такую концентрацию без всяких расчетов, и точность при этом не страдала, но подобные определения требовали большего времени.

Для повышения чувствительности прямой мышцы живота лягушки можно применять ряд фармакологических препаратов: эзерин, прозерин, уретан и др. Чувствительность мышцы повышается также при ее многосуточном хранении при низкой температуре.

При разведении фильтрата контрольной пробы (К) в 200 раз концентрация ацетилхолина должна составить $1 \cdot 10^{-6}$ при условии, что ацетилхолин не разрушился за время контакта с холинэстеразой (следует учесть, что трихлоруксусная кислота была прилита раньше ацетил-

холина). Такая концентрация ацетилхолина обычно дает субмаксимальное сокращение прямой мышцы. В исследуемых пробах (1, 2 и т. д.), где какая-то часть ацетилхолина разрушится за время контакта с холинэстеразой до момента приливания трихлоруксусной кислоты, концентрация ацетилхолина будет соответственно ниже. Путем сравнения с контрольными определениями можно будет установить, какой процент исходного количества ацетилхолина был разрушен.

Присутствие трихлоруксусной кислоты не препятствует количественному определению ацетилхолина на прямой мышце живота лягушки, так как при разведении пробы 1:200 концентрация кислоты составит уже $1{,}5 \cdot 10^{-4}$. Кроме того, происходит нейтрализация трихлоруксусной кислоты содой раствора Рингера, к тому же играет роль высокое разведение кислоты. Такое высокое разведение уже не влияет на ацетилхолиновое сокращение прямой мышцы живота лягушки.

Что же касается других активных веществ, переходящих также из препарата холинэстеразы (например, головного мозга), то и они существенно не влияют на определение ацетилхолина в фильтрате, разведенном в 200 раз.

Таким образом, тестирование на прямой мышце живота лягушки дает возможность просто, быстро и точно определять, какой процент исходного количества ацетилхолина разрушился за время контакта с холинэстеразой, причем ни остатки трихлоруксусной кислоты, ни активные вещества, экстрагированные из препарата холинэстеразы, не могут влиять на точность определения.

Вот почему в этих условиях можно ограничиться тестированием на одном объекте — прямой мышце живота лягушки. Если же возникают сомнения, то можно провести дополнительные определения на других тестообъектах, например на спинной мышце пиявки.

Применяя описанный метод, мы пользовались величиной так называемого времени полураспада (T_{50}). Это время, необходимое для того, чтобы разрушилась половина исходного количества ацетилхолина. Зная T_{50} в наших условиях, можно высчитать «коэффициент активности холинэстеразы» (QChE), т. е. количество ацетилхолина в миллиграммах, которое может быть разрушено холинэстеразой 1 г ткани за 1 час в условиях нашего опыта.

Гидролиз ацетилхолина идет с постоянной скоростью. Между временем, необходимым для реакции, и процентом разрушения ацетилхолина существует прямая пропорциональная зависимость. Вот почему эту пропорциональность удобно использовать для расчета времени полураспада исходного количества ацетилхолина.

В самом начале опыта время полураспада нам неизвестно. Мы берем время контакта ацетилхолина с холинэстеразой произвольно. Допустим, что в первом определении за время контакта (например, 120 секунд) разрушилось лишь 20% первоначального количества ацетилхолина. Исходя из прямой пропорциональной зависимости между временем контакта и процентом разрушения ацетилхолина, легко подсчитать, что если для разрушения 20% ацетилхолина потребовалось 120 секунд, то для разрушения 50% потребуется 300 секунд. Однако нужно проверить эту цифру прямым опытом, в котором время контакта будет 300 секунд. Если при повторном определении окажется не 50%, а 55% разрушенного ацетилхолина, то придется уточнить время полураспада в третьем определении, но уже время контакта следует уменьшить (например, до 270 секунд). Обычно 2 определений достаточно, чтобы получить результат с точностью в пределах ±5%. Изменяя время контакта, мы нередко получаем разные величины для времени полураспада. В подобных случаях следует считать более достоверным те данные, которые наиболее близки к 50%.

Приведем для примера выдержку из протокола опыта по определению активности холинэстеразы головного мозга белой мыши, к которому относятся приведенные выше цифры.

Опыт № 107 от 4 марта 1957 г. Определение активности холинэстеразы головного мозга белой мыши. Контроль (декапитация). Температура в термостате 38°

Порядок приливания составных частей и ход опыта	№ пробы					Примечание
	К	1	2	3	К	
Гомогенат мозга 1 : 8 (в мл)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Дистиллированная вода (в мл)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	
Трихлоруксусная кислота 15% (в мл)	1,0	—	—	—	1,0	

Порядок приливания составных частей и ход опыта	№ пробы					Примечание
	К	1	2	3	К	
Ацетилхолин $1 \cdot 10^{-3}$ (в мл)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	Непрерывное перемешивание
Длительность контакта (в секундах)	—	120	300	270	—	
Трихлоруксусная кислота 15% (в мл)	—	1,0	1,0	1,0	—	

Фильтрация. Разведение фильтрата в 200 раз раствором Рингера. Тестирование на прямой мышце живота лягушки.

Процент разрушения ацетилхолина	0	20	55	48	0	
Время полураспада T_{50} (в секундах)		300	272,7	281,3		
QChE (в мг/г/час)		96,0	105,6	102,4		

Проба К — контрольная: во флакон были налиты все ингредиенты, которые вошли и в опытные определения,— *1*, *2*, *3*, но в контрольных пробах ацетилхолин не разрушился, так как он был прибавлен после приливания трихлоруксусной кислоты. Пробы К принимают за 100% исходного количества ацетилхолина, а количество ацетилхолина, оставшееся неразрушенным в опытных пробах, определяют путем сравнения с пробами К.

Из процента разрушения за данное время высчитываем время полураспада T_{50}. В определениях *1, 2, 3* оно равно соответственно 300; 272,7 и 281,3 секунды.

Из трех полученных результатов наиболее достоверным является последний —281,3 секунды, так как он высчитан из того определения, в котором разрушилась почти половина (48%) исходного количества ацетилхолина. Из определения *2*, где разрушилось тоже около половины ацетилхолина (55%), получилась очень близкая цифра— 272,7 секунды. Расхождение с определением *3* только на 8,6 секунды, т. е. немногим более 3%. Только определение *1* (20%) дало значительное отклонение — на 18,7 секунды, или приблизительно на 6,2% от результатов *3*-го определения. Объясняется это тем, что в определении *1* разрушилось только 20% ацетилхолина, и расчет времени мог быть лишь весьма приблизительным. Этот результат является ориентировочным и дает возможность об-

легчить подбор времени полураспада в последующих определениях *2* и *3*.

Далее мы высчитываем коэффициент активности холинэстеразы (QChE).

Если T_{50} составляет 281, 3 секунды в наших условиях опыта, то за этот срок разрушилась половина добавленного ацетилхолина (1 мл в разведении $1 \cdot 10^{-3}$, т. е. 1 мг). Значит, за 281,3 секунды разрушилось 0,5 мг. Следовательно, за 60 минут разрушилось бы 6,4 мг. Мы использовали 3 мл гомогената мозга в разведении 1 : 48, что соответствует 1 мл в разведении 1 : 16. Принимая условно удельный вес мозга за единицу, можно сделать вывод, что 1 г цельного мозга разрушил бы за 60 минут в 16 раз больше ацетилхолина, т. е. $6{,}4 \times 16 = 102{,}4$ мг:

$$QChE = \frac{0{,}5 \text{ мг} \times 60 \text{ минут} \times 16 \text{ (разведение)}}{T_{50} = 4{,}7 \text{ минут}} = 102{,}1 \text{ мг/г/час.}$$

Во время определений концентрации оставшегося неразрушенным ацетилхолина после 3—4 приливаний жидкостей из опытных проб необходимо повторно приливать жидкость из контрольной пробы, чтобы выяснить, не изменилась ли чувствительность тест-объекта — мышцы к ацетилхолину. Оптимальным является использование мышцы, чувствительность которой к ацетилхолину по ходу опыта не меняется. Вместе с тем обычно чувствительность мышцы в конце опыта не снижается, даже несколько повышается, однако это не служит препятствием к работе с ней.

Тщательное перемешивание содержимого флакона во время реакции значительно повышает скорость гидролиза. Большое значение имеет также точная стабилизация температуры.

При помощи биологического метода Платтнера мы исследовали активность холинэстеразы головного мозга и мышечной ткани белых мышей, забитых декапитацией. Полученные данные были статистически обработаны по методике М. Л. Беленького (1959). Были вычислены суммы квадратов отклонений и найдена стандартная ошибка средней арифметической, также высчитаны доверительные границы при $P = 0{,}05$.

В табл. 1 приводятся результаты по определению активности холинэстеразы головного мозга белых мышей (контроль).

Таблица 1

Коэффициент активности холинэстеразы (в мг/г/час) головного мозга белых мышей

(контроль — декапитация)

X	X^2	X	X^2
62,3	3 881	100,0	10 000
109,0	11 880	45,3	2 052
100,0	10 000	96,0	9 216
96,0	921,6	114,0	13 000
88,9	7 903	94,0	8 836
102,1	10 402	53,3	2 841
65,7	4 316	87,3	7 621
102,1	10 402	102,0	10 400
92,3	8 519	96,0	9 216
87,3	7 621	126,3	15 887
84,2	7 090	96,0	9 216
32,0	1 024	62,4	3 894
72,0	6 184	154,8	23 745
102,1	10 402	94,1	8 855
87,3	76 21	42,5	1 806
106,7	11 255	64,7	4 186
85,7	7 344	102,1	10 402
100,0	10 000	125,0	15 630
45,3	2 052		
		3276,8	312 915

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{Ex^2n - (Ex)^2}{n^2(n-1)}} = \sqrt{\frac{11577855 - 10717418{,}24}{1369 \cdot 36}} = \sqrt{\frac{860436{,}76}{49284}} = \sqrt{17{,}46} = 4{,}2$$

$$\bar{x} + S_{\bar{x}} = 88{,}5 \pm 4{,}2 \text{ мг/г/час}$$

Доверительные границы при P=0,05:

80,3 ÷ 96,7 мг/г/час

X — величины коэффициента активности холинэстеразы,
X^2 — квадрат величины коэффициента активности холинэстеразы.

Таким же путем были получены данные, характеризующие холинэстеразную активность мышечной ткани белых мышей в норме, составляющие 14,1±1,1 (11,8÷÷16,4) мг/г/час.

БИОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД

Биохимический метод определения активности холинэстеразы по Хестрину основан на способности эфиров с короткой ацильной цепочкой вступать в реакцию с гидроксиламином в щелочной среде в стереометрических отношениях. Ацетилхолин реагирует с гидроксиламином по следующей схеме:

$$CH_3COOCH_2CH_2N(CH_3)_3 + H_2NOH \rightarrow CH_3CONOH + OHCH_2CH_2N(CH_3)_3$$

Образуются ацетгидроксамовая кислота и холин. Способность ацетгидроксамовой кислоты давать с солями трехвалентного железа окрашенные комплексы в кислой среде использована для колориметрического определения. Интенсивность пурпурно-коричневой окраски пропорциональна количеству ацетилхолина, связавшегося с гидроксиламином, который берется в избытке.

Экстинция (Е) пропорциональна концентрации окрашивающего вещества. Изготовив точный ряд разведений ацетилхолина, мы можем получить калибровочную кривую зависимости между величиной экстинции и концентрацией ацетилхолина. Это практически прямая линия, наклонная под определенным углом к оси абсцисс; тангенс этого угла и может служить коэффициентом пересчета величины экстинции в абсолютную величину содержания ацетилхолина.

Мы ставили ежедневно два контроля на спонтанный гидролиз ацетилхолина (см. Л. Г. Магазаник, 1959). Первый контроль заключался в том, что к смеси гомогената, буфера и воды добавляли сначала трихлоруксусную кислоту, а затем уже — ацетилхолин. Далее проводили, как обычно, реакцию с гидроксиламином и определяли экстинцию. В данном случае путем сравнения экстинции, полученной, например, в день опыта, с ранее полученными мы каждый день проверяли, не изменилась ли в результате хранения концентрация ацетилхолина. Если изменения обнаруживались, то в расчет вносили поправку.

Второй контроль дня — это контроль на спонтанный гидролиз ацетилхолина в ходе определения. Для этого приготовляли обычную смесь буфера, гомогената и воды, к которой с целью инактивации холинэстеразы добавляли 0,1 мл 1% раствора прозерина. Затем приливали ацетилхолин; смесь инкубировали и т. д. по обычной схеме (см. ниже). Если возникала разница между экстинциями 1 и 2 контролей, то она была следствием неферментативного распада ацетилхолина в ходе определения.

Этим методом мы исследовали активность холинэстеразы органов и тканей белых мышей, кошек и трупов людей. Для примера опишем методику определения активности холинэстеразы органов и тканей кошек, взятых для контрольных опытов. Кошек забивали различными способами. В одних случаях забивали воздушной эмбо-

лией сердца (введением в ушную вену с помощью шприца 10—15 см^3 воздуха). Гибель животных наступает быстро, однако техника введения воздуха сложна, животные ведут себя агрессивно. В других случаях животных забивали перерезкой сосудов шеи острой микротомной бритвой, однако вскоре мы оставили этот метод. Наконец, мы прибегли к третьему способу, который состоит в кровопускании после достижения полного обездвижения животного применением курареподобного препарата — дитилина (дихолинового эстера янтарной кислоты). Дитилин в условиях «управляемого дыхания» (искусственного) переносится животными в дозах, в 1000 раз больших, чем минимальные эффективные дозы. Это связано с тем, что он гидролизуется ложной холинэстеразой на физиологически мало активные вещества — холин и янтарную кислоту.

После взвешивания животного внутримышечно вводят дитилин в дозе 1 мг/кг. Через 1—2 минуты, когда животное ложится и не реагирует на раздражение, его сразу же привязывают к станку. Быстрым движением делают разрез на передней поверхности шеи, несколько ниже хрящей гортани, вскрывают трахею, в ее просвет вставляют стеклянную трубку и включают аппарат для искусственного дыхания. Всю эту процедуру необходимо проводить быстро, не допуская остановки дыхания, и при необходимости помощник массированием грудной клетки поддерживает дыхание.

Затем следует обнажить бедренную артерию и выпустить кровь в стаканчик (в пределах 20—30 мл), одновременно дефибринируя ее энергичным взбалтыванием метелочкой из тонких деревянных лучинок. Далее выпускают остальную кровь через обе бедренные артерии. Затем выключают искусственное дыхание, вскрывают грудную клетку, околосердечную сумку и надрезают верхнюю и нижнюю полые вены. Вскрывают левый желудочек сердца и канюлю вводят в восходящий отдел аорты, где укрепляют с помощью лигатуры. Через канюлю следует пропустить теплый физиологический раствор (1—1,5 л) в течение 1 часа для промывания органов и тканей от крови.

Производят забор кусочков органов и тканей, подлежащих исследованию. Кожу головы разрезают на уровне сагиттального шва и скальпируют вместе с уш-

ными раковинами; височные мышцы отслаивают распатором. Ручной дрелью делают отверстие в черепе. Отверстие расширяют кусачками и постепенно удаляют кости свода черепа. Удаляя затылочную кость, постепенно нужно перейти на шейный отдел позвоночника, перекусывая поперечные дужки и обнажая спинной мозг. Удаляют твердую мозговую оболочку, намет мозжечка и извлекают головной мозг вместе с шейным отделом спинного мозга. Пинцетом снимают мягкую мозговую оболочку. Если мозг очень бледен, то это говорит о том, что органы хорошо промыты физиологическим раствором и остатки крови удалены.

Ножницами осторожно снимают кору с извилин больших полушарий, стараясь при этом как можно меньше захватить белого вещества. Разрезом по краю мозолистого тела вскрывают боковые желудочки мозга и вырезают кусочек хвостатого ядра. Вырезают средний мозг, производят разрез по червячку мозжечка и вскрывают IV желудочек. Делают разрез по древу жизни мозжечка и вырезают кусочек ткани полушария мозжечка (в области зубчатого ядра). Затем вырезают кусочек продолговатого мозга, отступя от спинного мозга, а также отрезают часть спинного мозга, отступя от продолговатого.

Далее производят забор других органов: миокарда (боковая стенка левого желудочка, ближе к основанию), легких (краевые отделы), печени и мышечной ткани (большая ягодичная мышца). Часть крови центрифугируют для получения сыворотки.

Навески ткани растирают. Растертую ткань разводят дистиллированной водой в 5, 10, 15, 30 и 75 раз (в зависимости от уровня холинэстеразной активности органов и тканей). К 1 мл гомогената последовательно добавляют 1,5 мл фосфатного буфера при pH 7,8. К контрольным пробам добавляют 0,1 мл 1% раствора прозерина. Объем исследуемого гомогената доводят дистиллированной водой до 3 мл. Далее к гомогенату добавляют 1 мл 0,4% раствора ацетилхолинхлорида и смесь помещают на 30 минут при температуре 38° в водяную баню, где энергично перемешивают. По истечении указанного времени реакцию между ацетилхолином и холинэстеразой приостанавливают приливанием 1 мл 25% раствора трихлоруксусной кислоты, что сопровождается также осаждением белков.

К 1 мл фильтрата последовательно добавляют 2 мл равных количеств 2 М раствора хлористоводородного гидроксиламина и 3,5 Н раствора едкого натра и 1 мл концентрированной соляной кислоты в разведении 1:2. Затем приливают 1 мл 0,37 М раствора хлорного железа в 0,1 Н растворе соляной кислоты. Сразу же производят колориметрирование на фотоэлектроколориметре с использованием зеленого светофильтра при кювете 5,050 мм.

Для определения окраски контрольной пробы процедура ведется так же, как было описано выше, но только сначала добавляют раствор соляной кислоты, а затем щелочной раствор гидроксиламина и раствор хлорного железа.

На каждую пробу, как контрольную, так и опытную, мы производили по три определения.

Расчет ведется следующим образом. В реакционную смесь вносят 1 мл 0,4% раствора ацетилхолина, т. е. 4 мг (если оба контроля дня дали нулевое отклонение от исходной величины). Этому количеству ацетилхолина соответствует экстинция 0,370 (Еоп — Ек). Например, при инкубации 30 мг мозжечка (сырой вес) в течение 30 минут с 4 мг ацетилхолина осталось неразрушенным такое его количество, которому отвечает экстинция 0,097. Это значит, что разрушилось $100\% - \frac{0{,}097 \times 100}{0{,}370} = 73{,}8\%$ всего взятого в опыт ацетилхолина, или $\frac{4 \times 73{,}8}{100} = 2{,}95$ мг ацетилхолина.

Определяем коэффициент активности холинэстеразы, или количество ацетилхолина в миллиграммах, которое способно гидролизовать 1 г сырой ткани за 1 час при 38°.

Мы инкубировали 30 минут, значит, за 1 час разрушилось бы $2{,}95 \times 2 = 5{,}9$ мг ацетилхолина (линейность разрушения ацетилхолина во времени, как уже говорилось, специально проверяли). Мы брали 30 мг ткани мозжечка при перерасчете на 1 г (пропорциональность между количеством фермента и количеством разрушенного ацетилхолина также проверяли):

$$\frac{5{,}9 \times 1000}{30} = 196{,}6 \text{ мгах/1 г сырого веса/1 час.}$$

Приводим выписку из протокола типичного опыта (опыт № 874) по определению активности холинэстеразы органов и тканей кошки, взятой для контроля.

Активность холинэстеразы эритроцитов можно не оп
ределять. Ее можно высчитать по коэффициентам акти-
ности холинэстеразы цельной крови и сыворотки. По

Опыт № 874 от 12 июля 1961 г. Определение активности холинэстеразы органов и тканей кошки. Кошка весом 3200 г. Дитилин внутримышечно 3,2 мл 1% раствора. Искусственное дыхание. Убита кровопусканием. Температура в термостате 38°

Порядок приливания составных частей и ход опыта	Кровь цельная							Сыворотка цельная		Миокард 1 : 5			Мышца 1 : 5			Легкие 1 : 5			Печень 1 : 5			Кора головного мозга 1 : 5			Хвостатое ядро 1 : 75			Средний мозг 1 : 5			Мозжечок 1:30			Продолговатый мозг 1 : 10			Спинной мозг 1 : 5		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Фосфатный буфер 7,8 (в мл)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Дистиллированная вода (в мл)	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	—	—	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Прозерин 1% (в мл)	0,1	0,1	0,1																																				
Гомогенат (в мл)	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ацетилхолин 0,4% (в мл)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Время контакта (в минутах)	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Трихлоруксусная кислота 25% (в мл)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E_o	0,390	0,380	0,391	0,163	0,151	0,160	0,041	0,050	0,054	0,271	0,280	0,282	0,262	0,240	0,251	0,178	0,169	0,170	0,114	0,123	0,122	0,187	0,193	0,191	0,140	0,141	0,141	0,071	0,075	0,079	0,081	0,089	0,085	0,076	0,072	0,071	0,060	0,059	0,058
Ср. E_o		0,387			0,158			0,048			0,278			0,251			0,172			0,120			0,190			0,141			0,075			0,085			0,073			0,059	
$E_к$		0,030			0,029			0,028			0,030			0,029			0,129			0,029			0,029			0,030			0,028			0,028			0,028			0,028	
Ср. E_o—$E_к$		0,357			0,129			0,020			0,248			0,222			0,143			0,091			0,161			0,111			0,047			0,057			0,045			0,031	
Процент сохранившегося ацетилхолина		100			36,1			5,6			70,0			62,2			40,0			25,5			45,1			31,1			13,1			16,0			12,6			8,7	
Процент разрушенного ацетилхолина		0			63,9			94,4			30,0			37,8			60,0			74,5			54,9			68,9			86,9			84,0			87,4			91,3	
QChE (в мг/г/час)					5,0			3,7			11,7			14,7			23,4			29,1			21,4			406,1			101,7			196,6			68,2			35,6

, наоборот, хорошо дополняют друг друга.

Активность холинэстеразы эритроцитов можно не определять. Ее можно высчитать по коэффициентам активности холинэстеразы цельной крови и сыворотки. Допу-

Опыт № 874 от 12 июля 1961 г. Определение активности холинэстер
Убита кро

Порядок приливания составных частей и ход опыта	Кровь цельная						Сыворотка цельная			Миокард 1 : 5			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1
Фосфатный буфер 7,8 (в мл)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,5	1,
Дистиллированная вода (в мл)	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	—	—	—	0,5	0,5	0,5	0,
Прозерин 1% (в мл)	0,1	0,1	0,1										
Гомогенат (в мл)	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1
Ацетилхолин 0,4% (в мл)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Время контакта (в минутах)	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Трихлоруксусная кислота 25% (в мл)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E_o	0,390	0,380	0,391	0,163	0,151	0,160	0,041	0,050	0,054	0,271	0,280	0,282	0,262
Ср. E_o		0,387			0,158			0,048			0,278		
$E_к$		0,030			0,029			0,028			0,030		
Ср. E_o—$E_к$		0,357			0,129			0,020			0,248		
Процент сохранившегося ацетилхолина		100			36,1			5,6			70,0		
Процент разрушенного ацетилхолина		0			63,9			94,4			30,0		
QChE (в мг/г/час)					5,0			3,7			11,7		

, наоборот, хорошо дополняют друг друга.

можно не оп-
циентам актив-
воротки. Допу

961 г. Определение активности холинэстеразы органов и тканей кошки. Кошка весом 3200 г. Убита кровопусканием. Температура в термостате 38°

		Сыворотка цельная			Миокард 1 : 5			Мышца 1 : 5			Легкие 1 : 5			Печень 1 : 5			Кора г мозг
5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
,5	1,5	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
,5	0,5	—	—	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
151	0,160	0,041	0,050	0,054	0,271	0,280	0,282	0,262	0,240	0,251	0,178	0,169	0,170	0,114	0,123	0,122	0,187	0,1
158			0,048			0,278			0,251			0,172			0,120			
,029			0,028			0,030			0,029			0,129			0,029			0,1
,129			0,020			0,248			0,222			0,143			0,091			0,0
36,1			5,6			70,0			62,2			40,0			25,5			0,1
																		45
63,9			94,4			30,0			37,8			60,0			74,5			
5,0			3,7			11,7			14,7			23,4			29,1			54
																		21

друга.

45

в и тканей кошки. Кошка весом 3200 г. Дитилин внутримышечно 3,2 мл 1% раствора. Иску
. Температура в термостате 38°

	Легкие 1 : 5			Печень 1 : 5			Кора головного мозга 1 : 5			Хвостатое ядро 1 : 75			Средний мозг 1 : 5			Мозжечок 1:		
5	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	
5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	3
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
251	0,178	0,169	0,170	0,114	0,123	0,122	0,187	0,193	0,191	0,140	0,141	0,141	0,071	0,075	0,079	0,081	0,089	0,
	0,172				0,120		0,190			0,141			0,075			0,085		
	0,129				0,029		0,029			0,030			0,028			0,028		
	0,143				0,091		0,161			0,111			0,047			0,057		
	40,0				25,5		45,1			31,1			13,1			16,0		
	60,0				74,5		54,9			68,9			86,9			84,0		
	23,4				29,1		21,4			406,1			101,7			196,6		

внутримышечно 3,2 мл 1% раствора. Искусственное дыхание.

Хвостатое ядро 1 : 75			Средний мозг 1 : 5			Мозжечок 1:30			Продолговатый мозг 1 : 10			Спинной мозг 1 : 5		
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
91	0,140	0,141	0,141	0,071	0,075	0,079	0,081	0,089	0,085	0,076	0,072	0,071	0,060	0,059	0,058
	0,141			0,075			0,085			0,073			0,059	
	0,030			0,028			0,028			0,028			0,028	
	0,111			0,047			0,057			0,045			0,031	
	31,1			13,1			16,0			12,6			8,7	
	68,9			86,9			84,0			87,4			91,3	
	406,1			101,7			196,6			68,2			35,6	

Активность холинэстеразы эритроцитов можно не определять. Ее можно высчитать по коэффициентам активности холинэстеразы цельной крови и сыворотки. Допустим, что коэффициент активности холинэстеразы цельной крови составляет 5 мг/г/час, а сыворотки — 3,7 мг/г/час. Из этого нельзя делать вывод, что активность холинэстеразы эритроцитов равна 1,3 мг/г/час, потому что 5 мг/г/час — это активность холинэстеразы 1 мл цельной крови, а 3,7 мг/г/час — активность холинэстеразы 1 мл сыворотки. С помощью гематокрита мы установили, что в крови 55% сыворотки и 45% эритроцитов. Отсюда: 3,7 мг/г/час составляют 100%, X мг/г/час составляют 55%, откуда X=2,035 мг/г/час.

Это значит, что 55% сыворотки 1 мл цельной крови имеют активность, равную 2,035 мг/г/час; на 45% эритроцитов 1 мл цельной крови приходится 5—2,035= =2,965 мг/г/час. Отсюда: 2,965 мг/г/час составляют 45%, X мг/г/час составляют 100% и, следовательно, X= =6,6 мг/г/час.

Таким образом, в приведенном опыте коэффициент активности холинэстеразы цельной крови составляет 5 мг/г/час, сыворотки —3,7 мг/г/час, эритроцитов — 6,6 мг/г/час.

В табл. 2 приводятся результаты наших опытов (Я. С. Смусин, 1963) по определению коэффициента активности холинэстеразы органов и тканей 12 кошек в норме, полученные биохимическим методом, близкие к данным других авторов (Л. Г. Магазаник, 1959, и др.).

ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД

Гистохимические методы определения активности холинэстеразы позволяют судить о локализации холинэстеразы в различных клеточных структурах. В этом их принципиальное отличие от биологических и химических методов, описанных ранее.

Весьма приблизительное количественное определение активности холинэстеразы гистохимическими методами возможно, но главное их назначение выяснить распределение фермента между различными тканевыми структурами. Поэтому гистохимические методы, с одной стороны, и биологические или химические методы с другой— не заменяют, а, наоборот, хорошо дополняют друг друга.

Таблица 2

Коэффициент активности холинэстеразы (в мг/г/час) органов и тканей кошек (контроль)

Миокард	Мышцы	Легкие	Печень	Кора головного мозга	Хвостатое ядро
1	2	3	4	5	6
7,5±1,0	8,6± 1,3	18,8±1,4	20,3± 2,5	16,4± 1,3	386,9± 25,1
5,3÷9,7	5,7÷11,5	15,6÷22,0	14,6÷26,0	13,5÷19,3	331,7÷442,1

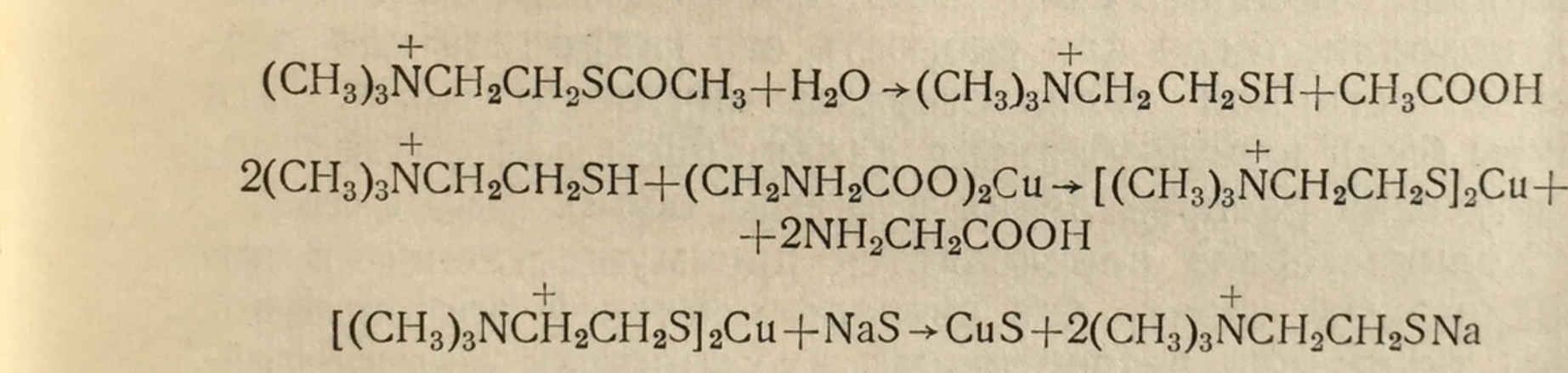
Продолжение

Средний мозг	Мозжечок	Продолговатый мозг	Спинной мозг	Кровь	Сыворотка	Эритроциты
7	8	9	10	11	12	13
76,3 ±5,2	143,7± 26,4	56,8±3,5	25,6± 2,0	4,9±1,0	2,9±0,3	4,9±1,2
64,9÷87,7	85,6÷201,8	49,1÷64,5	21,1÷30,1	2,6÷7,2	12, ÷3,7	1,8÷8,0

В 1948 г. Gomori впервые опубликовал метод гистохимического определения холинэстеразы, основанный на гидролитическом расщеплении холиновых эфиров высокомолекулярных кислот под влиянием холинэстеразы тканей.

Однако этот метод оказался неудовлетворительным, так как активность холинэстеразы ткани по отношению к холиновым эфирам высокомолекулярных кислот ничтожно мала, а способ фиксации ткани (в холодном ацетоне с последующей двойной заливкой в целлоидин и парафин) приводит к добавочному, причем значительному, снижению активности фермента.

В 1949 г. Koelle и Friedenwald предложили оригинальный метод определения холинэстеразы, основанный на энзиматическом расщеплении сернистого аналога ацетилхолина — ацетилтиохолина. Образующийся в местах локализации холинэстеразы тиохолин осаждается в виде плохо растворимого меркаптида меди, а последний при обработке ткани сернистым аммонием превращается в нерастворимый темно-коричневого цвета осадок сульфида меди. При этом химические реакции могут быть представлены следующими уравнениями:



$$(CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CH_2SCOCH_3 + H_2O \rightarrow (CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CH_2SH + CH_3COOH$$

$$2(CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CH_2SH + (CH_2NH_2COO)_2Cu \rightarrow [(CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CH_2S]_2Cu + 2NH_2CH_2COOH$$

$$[(CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CH_2S]_2Cu + NaS \rightarrow CuS + 2(CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CH_2SNa$$

Метод состоял в инкубации свежезамороженных срезов (или расщепленных препаратов) в среде, содержащей 0,004 М ацетилтиохолина, 0,002 М сульфата меди и 0,008 М глицина при pH 8,06, в течение 10—60 минут. После гидролиза освобождающийся тиохолин реагировал с солью меди с образованием относительно нерастворимого производного тиохолина меди. Для облегчения процесса осаждения и для предотвращения диффузии инкубационная среда насыщалась тиохолинатом меди, прежде чем в нее помещались срезы. Это было решающим моментом в оригинальном варианте метода, и эта же манипуляция сохранила свое значение в двух модификациях метода, позднее предложенных Koelle (1951).

Модификация метода позволяет достичь гораздо более четкой локализации осадка путем проведения реакции при строго определенном pH. В инактивированных контрольных срезах, инкубированных в тех же растворах, окраска не появляется. Такие контроли готовили, выдерживая только что приготовленные срезы в течение 30 минут при комнатной температуре в 0,001 М растворе диизопропилфторфосфата, приготовленном на 0,85% солевом растворе (при этой концентрации ДФФ необратимо угнетает как истинную, так и ложную холинэстеразу). Тщательно промытые контрольные срезы переносили в инкубационную среду. После инкубации опытные и контрольные срезы промывали и обрабатывали желтым сульфидом аммония для превращения белого осадка медной соли тиохолина в коричневый аморфный осадок сульфида меди.

Koelle пришел к выводу, что ложная холинэстераза тканей кошки полностью подавляется при инкубации с 10^{-6} М ДФФ при 38° и pH 6,4 в течение 30 минут. Эта обработка уменьшает активность истинной холинэстеразы приблизительно до 60%. Koelle пришел также к заключению, что бутирилтиохолин расщепляется ложной холинэстеразой с большей скоростью, чем ацетилхолин или ацетилтиохолин, тогда как скорость его гидролиза под действием истинной холинэстеразы ничтожно мала. Эти факты были использованы в дальнейшем для раздельного изучения распределения в тканях обоих ферментов.

Холинэстераза определяется преимущественно в поверхностных слоях, что связано с плохой проницаемостью ткани для четвертичных аммонийных соединений, к которым относятся эфиры холина. В. В. Португалов и В. А. Яковлев (1951, 1953), видоизменив метод Келле, добились искусственного увеличения проницаемости клеточных оболочек для холиновых эфиров путем выдерживания кусочков тканей в ацетоне, а инактивация фермента предотвращалась выдерживанием ткани на холоду (—15°). Gerebtzoff (1953) предлагает собственную модификацию метода Келле с предварительной фиксацией в нейтральном формалине небольших кусочков тканей и с последующей дофиксацией срезов.

В последнее время появился ряд работ, в которых ставится под сомнение специфичность метода Келле — Фриденвальда. Однако многочисленные исследования с

использованием специфических ингибиторов холинэстеразы дают полное право считать, что метод Келле является строго специфичным способом определения локализации холинэстеразы.

Для гистохимического исследования активности холинэстеразы мы пользовались методом Келле — Фриденвальда (1949) в модификации В. В. Португалова и В. А. Яковлева (1951, 1953).

Приводим подробное изложение этого метода в том варианте, в котором мы его применяли (Я. С. Смусин, 1955).

Приготовление растворов производится следующим образом.

Раствор А: 3,75 г гликокола; 18 мл нормального раствора едкого калия; 82 мл дистиллированной воды.

Раствор Б: 2,5 г кристаллический сернокислой меди; 100 мл дистиллированной воды.

Раствор В: 7,5 мг ацетилтиохолиниодида; 0,4 мл дистиллированной воды; 0,1 мл раствора Б.

Образующийся при этом осадок йодистой меди отделяется при центрифугировании.

Прописи инкубационной смеси с ацетилтиохолиниодидом:

0,2 мл раствора А;
0,1 мл раствора Б;
4,3 мл дистиллированной воды.

Смесь выдерживается несколько минут в термостате при температуре 37°, прибавляется фильтрат раствора В и затем фильтруется.

Прописи инкубационной смеси с бутирилтиохолинбромидом:

6 мг бутирилтиохолинбромида;
0,2 мл раствора А;
0,1 мл раствора Б;
4,7 мл дистиллированной воды.

Раствор подвергается фильтрованию.

Растворы ацетилтиохолиниодида, бутирилтиохолинбромида и раствор В готовятся перед их употреблением на бидистиллированной воде.

Мышей забивали декапитацией. Вырезали кусочки исследуемой ткани небольших размеров (до 1×1 см при толщине до 0,5 см) и тотчас же на замораживающем микротоме приготовляли срезы толщиной до 40—60 μ (для мышечной ткани) или до 10—20 μ (для головного мозга). Б. Ромейс (1953), справедливо отмечая, что обычным замораживающим микротомом получить хорошие срезы из свежих нефиксированных препаратов удается

лишь с трудом, рекомендует употреблять нож глубокого охлаждения. Мы достигали глубокого охлаждения ножа, насаживая на него охлаждающую коробку с сухим льдом. Можно пользоваться микротомом на полупроводниках.

Срезы с ножа непосредственно переносятся в инкубационную смесь с ацетилтиохолиниодидом (для определения истинной холинэстеразы) или в инкубационную смесь с бутирилтиохолинбромидом (для определения ложной холинэстеразы). Контрольные срезы перед погружением в растворы субстратов предварительно помещают на 30 минут в раствор прозерина ($1 \cdot 10^{-3}$), что приводит к полной инактивации фермента, так как прозерин является сильнейшим ингибитором холинэстеразы.

Далее срезы помещают в термостат при температуре 37° для инкубации холинэстеразы. Время инкубации определяется в зависимости от степени активности фермента (мы варьировали от 20 минут до 2—3 часов). В тех случаях, когда необходимо было провести сравнительную оценку степени активности фермента, период инкубации был строго одинаков. Практически можно проводить инкубацию в течение 1 часа — время, достаточное для хорошего выявления фермента.

После инкубации срезы хорошо ополаскивают в 2—3 порциях бидистиллированной воды (для освобождения их от остатков субстрата) и наклеивают на предметные стекла, после чего обрабатывают 10% раствором сернистого натрия в течение 1 минуты. Далее срезы тщательно промывают в нескольких порциях бидистиллированной воды (для освобождения от раствора сернистого натрия во избежание артефакта), обезвоживают спиртами восходящей крепости (50°, 70°, 85°, 96°, абсолютный спирт и спирт-эфир), просветляют карбол-ксилолом и 3 порциями ксилола и заключают в канадский бальзам.

Приготовленные по описанному методу препараты дают возможность наблюдать локализацию холинэстеразы лишь в поверхностных слоях ткани. Для увеличения проницаемости клеточных оболочек мы воспользовались способом, предложенным В. В. Португаловым и В. А. Яковлевым (1951, 1953): кусочки исследуемой ткани предварительно выдерживают в ацетоне в течение 3—24 часов при температуре около —60° (в сосуде Дюа-

ра с сухим льдом), затем тщательно отмывают от ацетона. Далее приготовляют срезы, которые подвергают последующей обработке, как было описано выше.

Темно-коричневые участки соответствуют местам локализации истинной холинэстеразы, причем интенсивность окраски пропорциональна активности фермента. При обработке бутирилтиохолинбромидом ткань окрашивается диффузно в бледно-желтый цвет. Это говорит о том, что ложная холинэстераза распределяется в тканях также диффузно.

Бутирилтиохолинбромид выявляет локализацию только ложной холинэстеразы. Поэтому, если он сплошь окрашивает всю ткань в бледно-желтый цвет, не оставляя неокрашенных участков, соответствующих локализации истинной холинэстеразы, то из этого вытекает, что в местах локализации истинной холинэстеразы имеется и ложный фермент (Я. С. Смусин, 1957).

Локализация истинной холинэстеразы в поперечнополосатой мускулатуре соответствует распределению шванновских элементов, сопровождающих аксон в зоне органного синапса, т. е. в моторной бляшке (рис. 9). Саркоплазма мышечного волокна в участках, непосредственно прилегающих к моторной бляшке, имеет очень слабую окраску. Места же контакта нерва с мышцей уже при малом увеличении микроскопа легко обнаруживаются по интенсивной окраске (рис. 10, 11). Большое увеличение микроскопа (рис. 12) дает возможность выявить ряд деталей (в особенности в тех препаратах, где кусочки были предварительно обработаны ацетоном): видны даже нервные окончания, доходящие до мышечных волокон (рис. 13). На поперечных срезах (рис. 14, 15) мышечного волокна также видно, что вещество моторной бляшки, плотно прилегая к мышечному волокну, оказывается отделенным от него тончайшей мембраной, что соответствует данным В. В. Португалова (1955) и данным ультраструктурных электронномикроскопических исследований (Э. М. Плисецкая, 1961).

Помимо моторных бляшек, истинная холинэстераза содержится также в ядрах мышечных волокон. Предварительная обработка срезов прозерином полностью угнетает активность истинной холинэстеразы (рис. 16).

В мышечной ткани ложная холинэстераза распределяется диффузно.

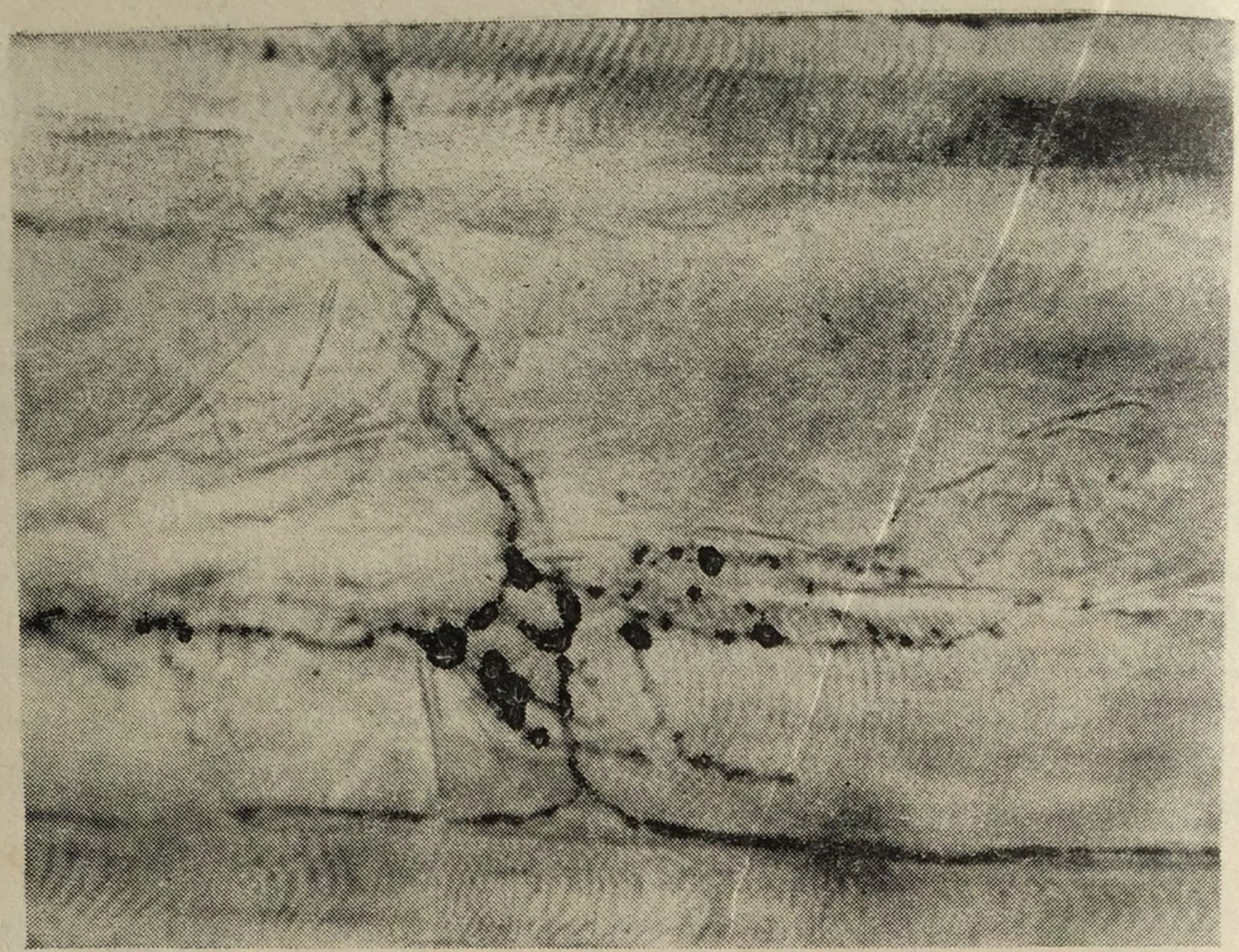


Рис. 9. Двигательное нервное окончание в скелетной мышце лягушки с концевыми разветвлениями. Общий вид локализации истинной холинэстеразы. Окраска по Нисслю. Ок. 5, об. 40.

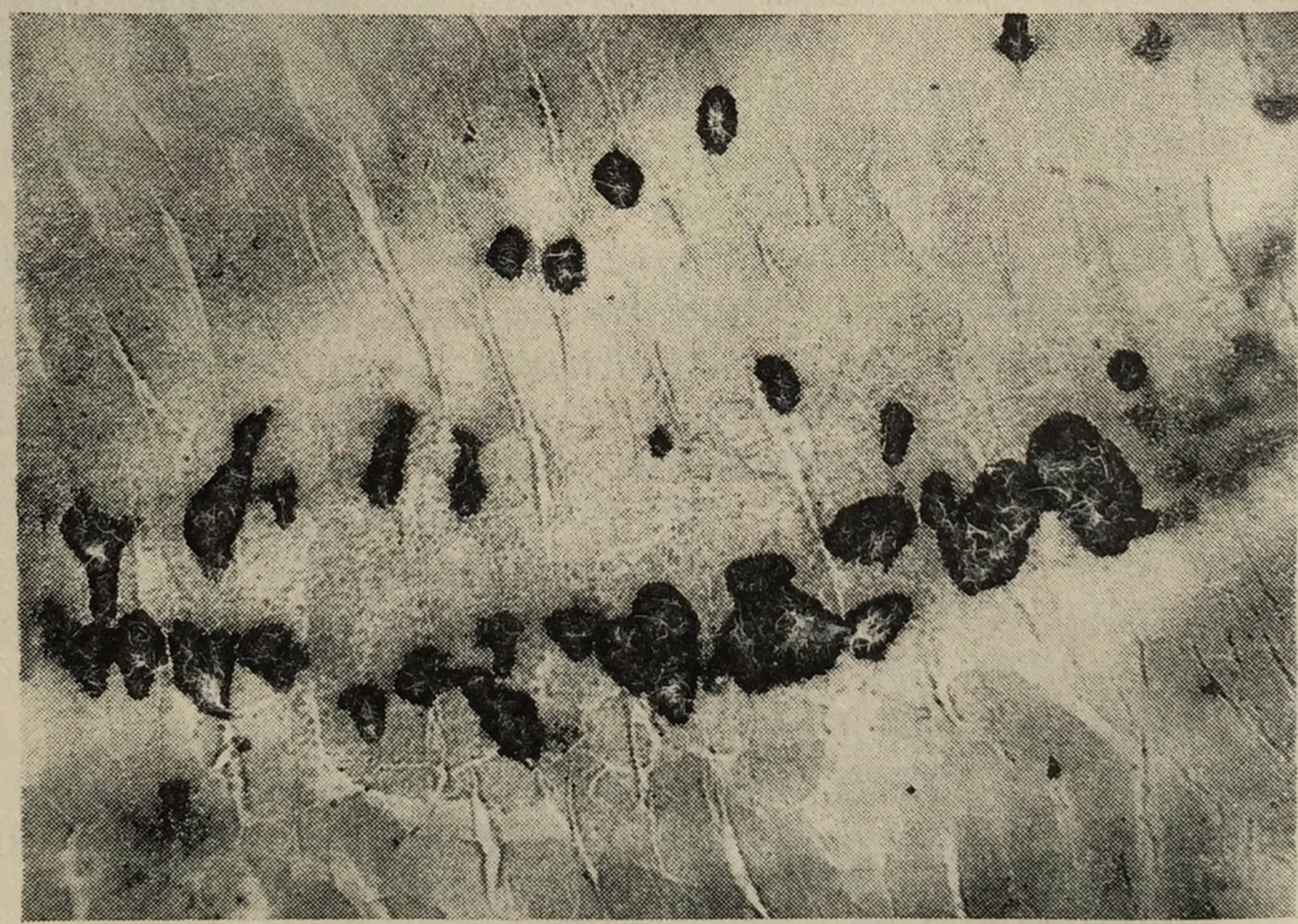


Рис. 10. Икроножная мышца белой мыши. Продольный срез. Ок. 5, об. 8 (объяснение см. в тексте).

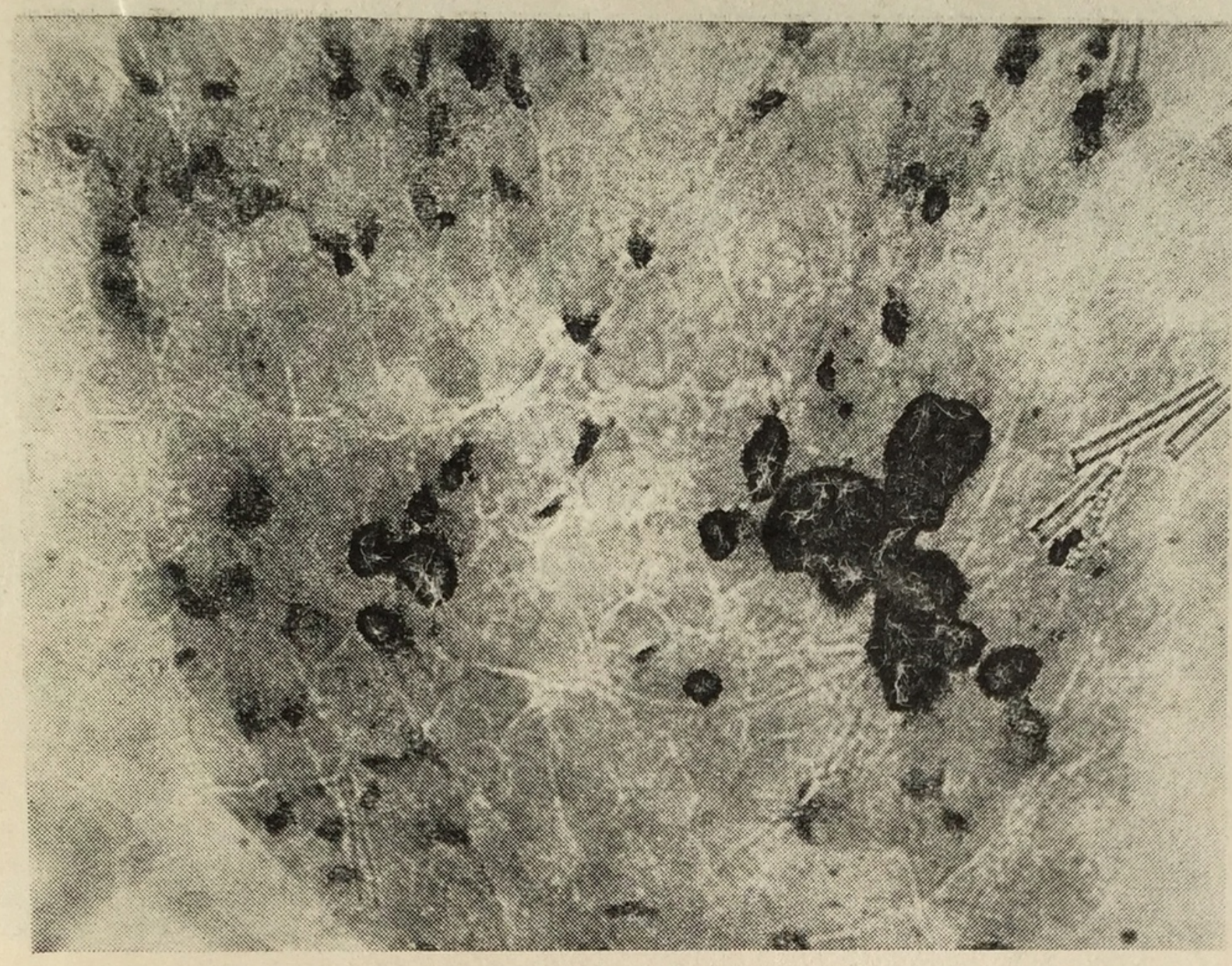


Рис. 11. Икроножная мышца белой мыши. Поперечный срез. Ок. 5, об. 8 (объяснение см. в тексте).

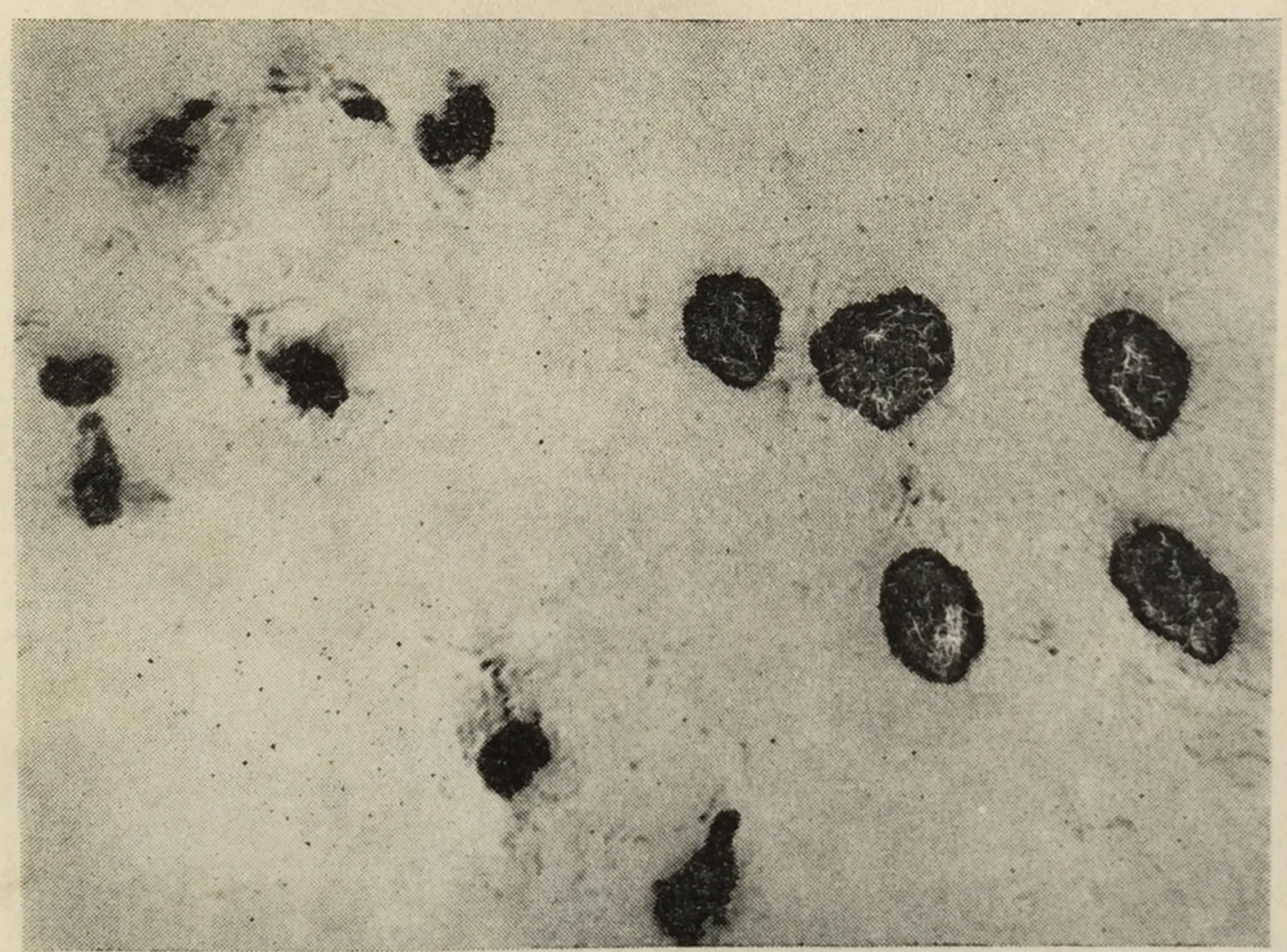


Рис. 12. Икроножная мышца белой мыши. Видны полиморфные структуры, образующие основу моторных бляшек. Ок. 5, об. 20.

Рис. 13. Икроножная мышца белой мыши. Моторные бляшки и оканчивающееся на одной из них эффекторное нервное окончание. Ок. 5, об. 20.

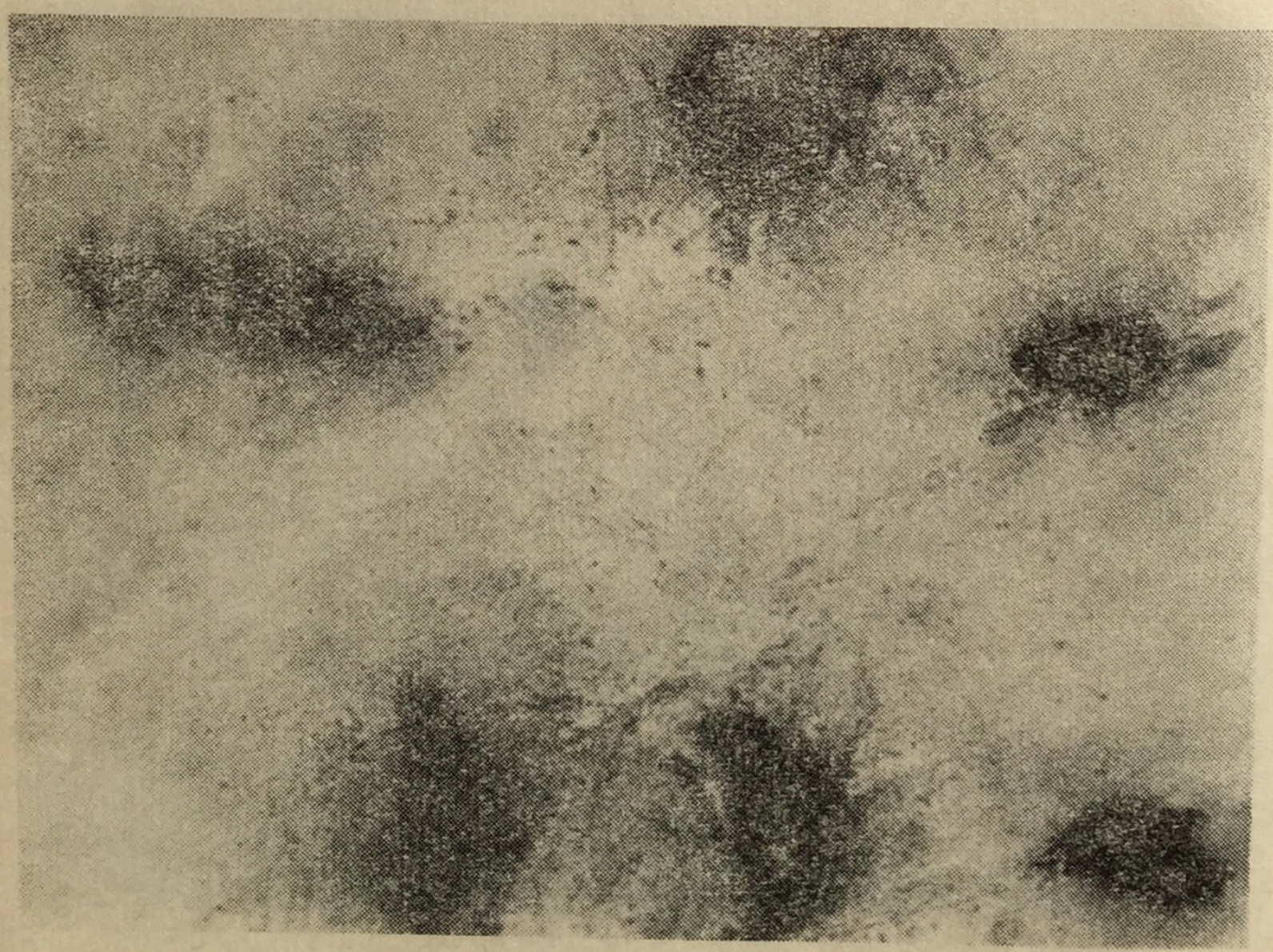


Рис. 14. Икроножная мышца белой мыши. Продольный срез. Ок. 5, об. 40 (объяснение см. в тексте).

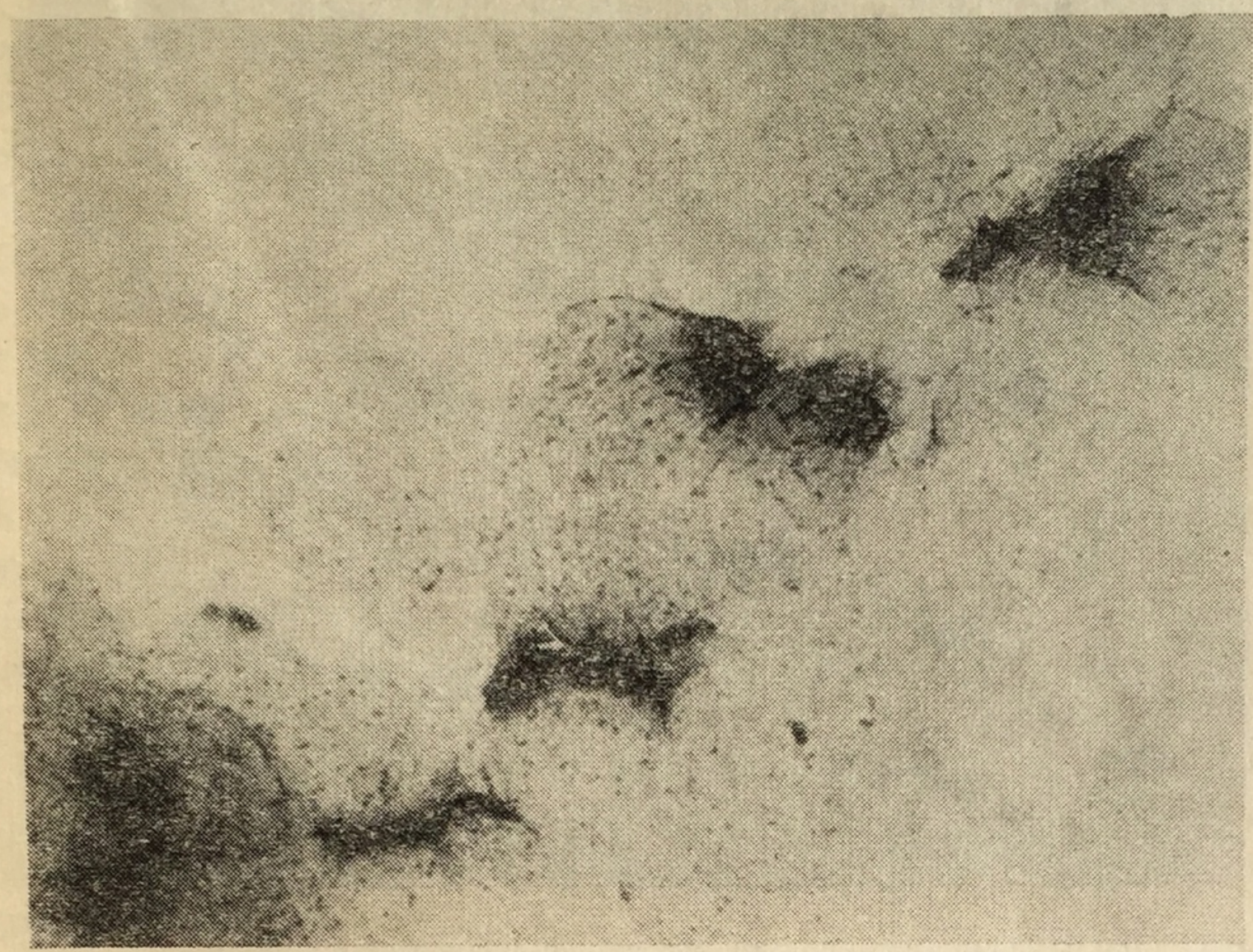


Рис. 15. Икроножная мышца белой мыши. Поперечный срез. Ок. 5, об. 40 (объяснение см. в тексте).

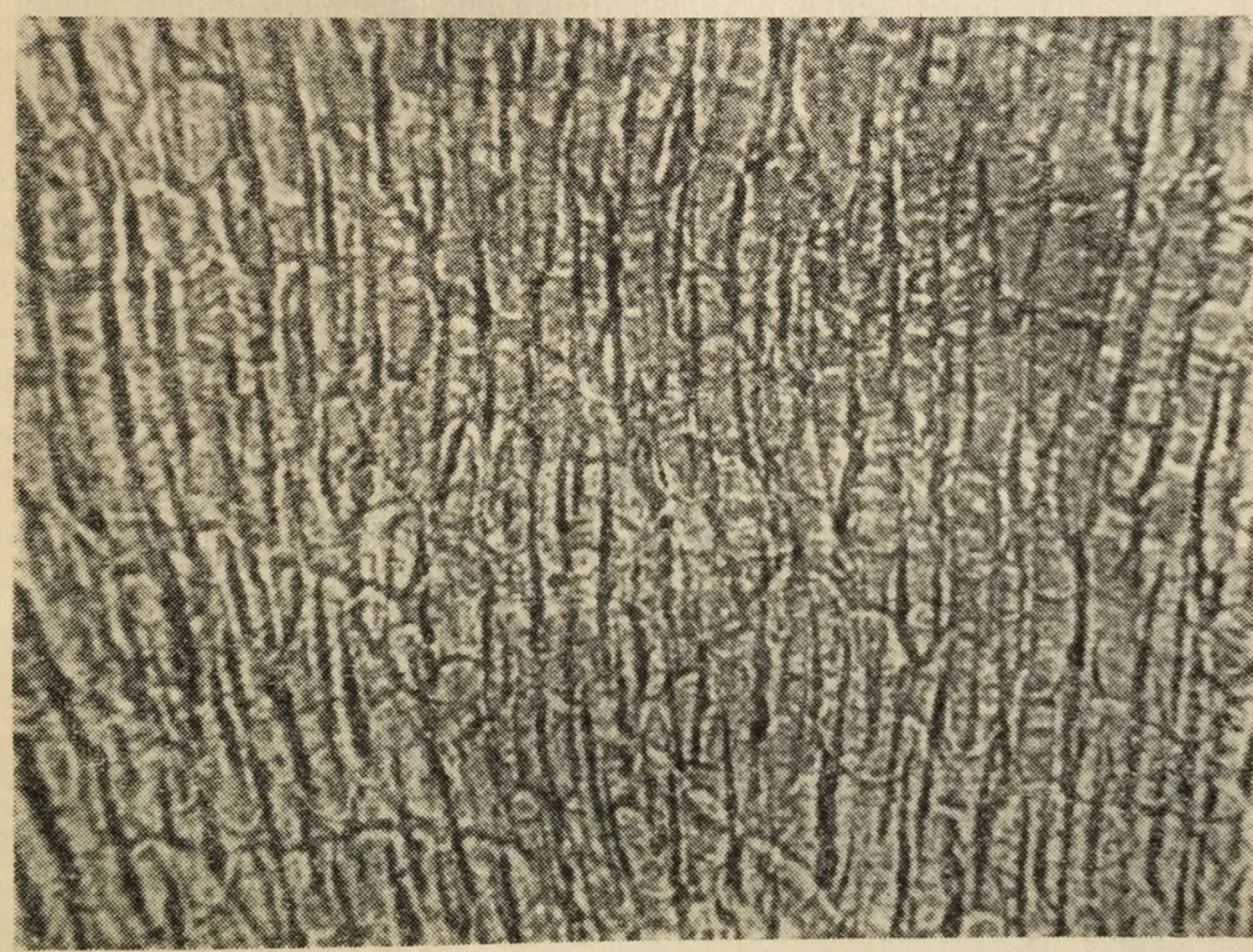


Рис. 16. Икроножная мышца белой мыши. Предварительная обработка прозерином. Ок. 5, об. 8 (объяснение см. в тексте).

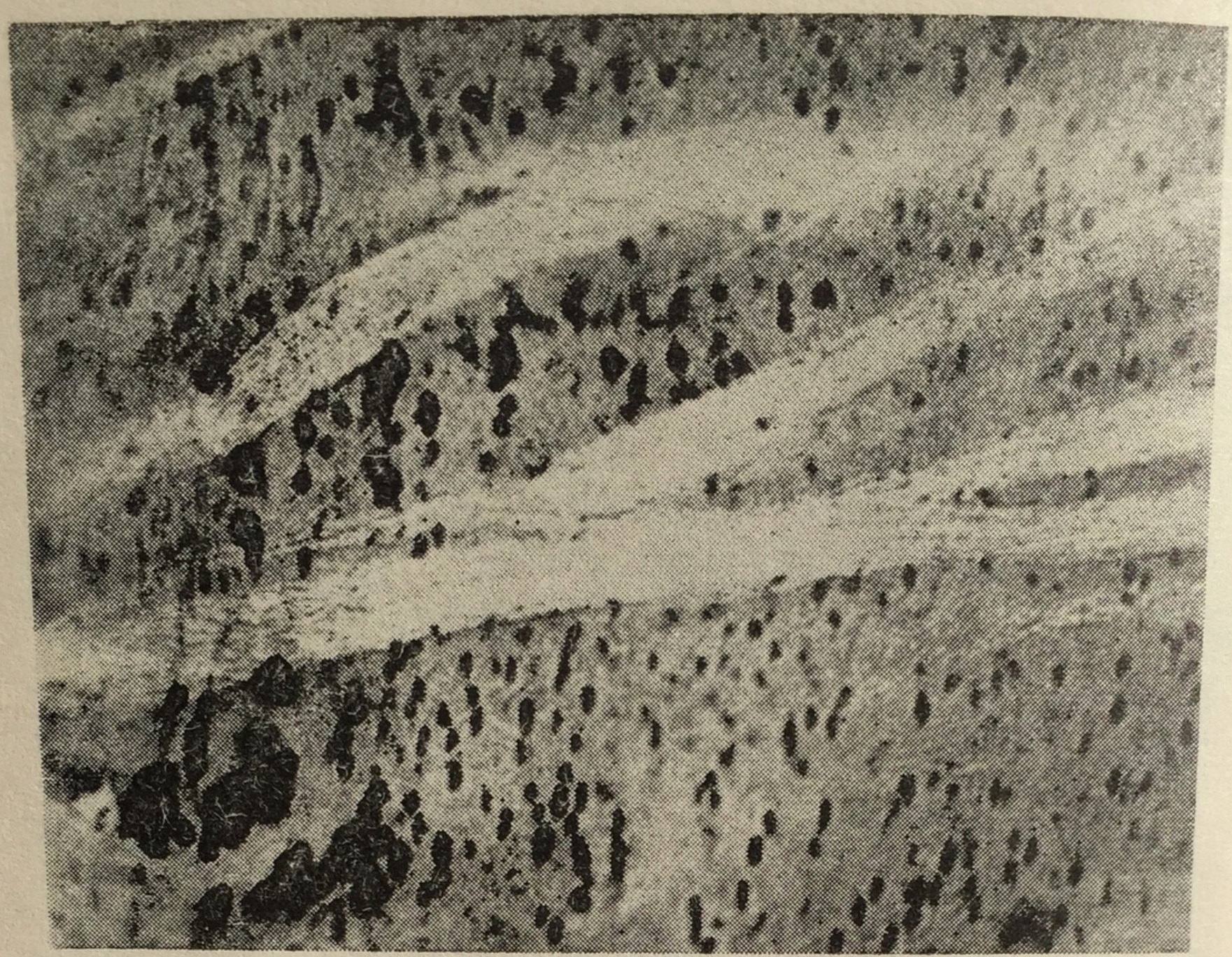


Рис. 17. Головной мозг белой мыши. Головка хвостатого ядра. Высокой холинэстеразной активностью обладают нервные клетки. Ок. 5, об. 8.

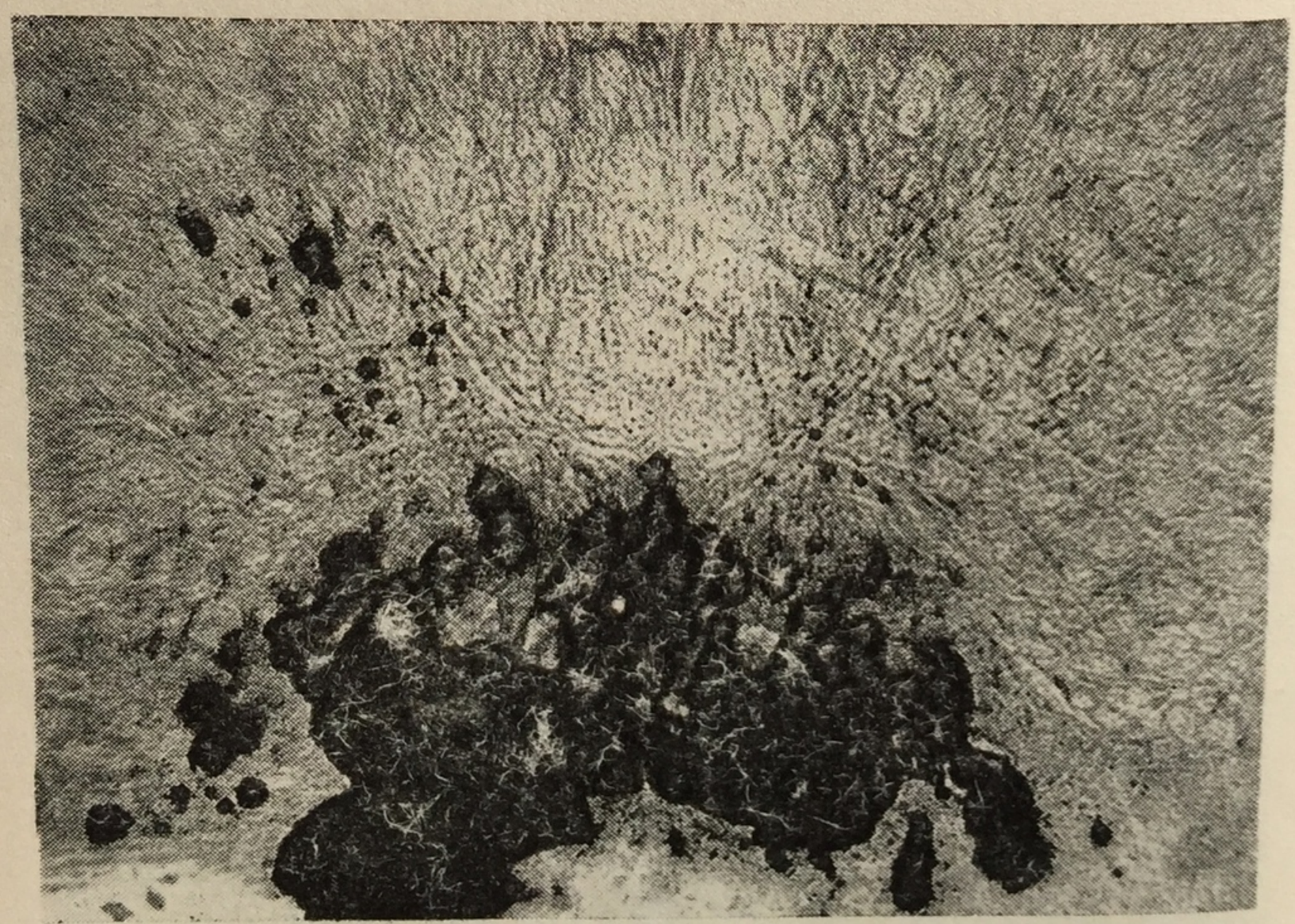


Рис. 18. Продолговатый мозг белой мыши. Моторные ядра в области внутренне-наружных отделов передних рогов в виде округлых образований с темным центром и светлым ободком. Ок. 5, об. 8.

В коре головного мозга наблюдается довольно интенсивное диффузное прокрашивание. Четко выделяются нервные клетки — они окрашены в желтовато-коричневый цвет. Ганглиозные клетки в области аммонова рога обладают довольно высокой холинэстеразной активностью.

В подкорковых образованиях хорошо выражена слоистость в области овального центра; глия в этих отделах также обладает высокой холинэстеразной активностью; клетки светло-коричневого цвета, с четкими границами. В области лучистой короны на фоне ярко-желтого диффузного окрашивания ткани также видны довольно крупные ганглиозные клетки и глия, обладающая высокой холинэстеразной активностью. В области хвостатого ядра и в особенности его головки очень высока холинэстеразная активность нервных клеток (рис. 17). Зрительный бугор более бледно диффузно окрашен, и активность холинэстеразы клеток глии ниже остальных отделов подкорковых узлов.

На разрезе на уровне заднего отдела стволовой части мозга и тела мозжечка видно диффузное окрашивание ткани, более ярко выраженное в области тела мозжечка. Нервные клетки центрального отдела стволовой части мозга обладают в умеренной степени холинэстеразной активностью. Четко видны моторные ядра в виде крупных округлой формы образований с желтовато-коричневым центром и светлым ободком по периферии. Они располагаются в нижне-латеральных отделах стволовой части мозга, что соответствует ядрам VII и VIII пары черепномозговых нервов, а также рубро-спинальному, или экстрапирамидному, пучку и заднему мозжечковому пучку бокового канатика.

При микроскопическом исследовании продолговатого мозга отмечается диффузное окрашивание ткани в желтоватый цвет, умеренно выраженная холинэстеразная активность ганглиозных клеток центральных и периферических отделов. В области внутренне-наружных отделов передних рогов располагаются крупные моторные ядра округлой формы с темно-коричневым центром и светлым ободком (рис. 18).

Глава III

АКТИВНОСТЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗ В ЗДОРОВОМ ОРГАНИЗМЕ И ПРИ НЕКОТОРЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Для оценки степени угнетения веществами антихолинэстеразного действия активности холинэстеразы в той или иной ткани необходимо знать пределы колебаний активности холинэстеразы различных тканей у людей, умерших от других причин (не от отравлений антихолинэстеразными веществами), и проследить за снижением холинэстеразной активности по мере разложения трупа. Составление такого «атласа» холинэстеразной активности тканей трупов людей «в норме» является важной задачей для судебной медицины.

УРОВЕНЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КРОВИ

У людей как в норме, так и при некоторых патологических процессах наиболее детально изучена холинэстеразная активность крови.

Известно, что у каждого здорового человека активность холинэстеразы крови является величиной относительно постоянной, хотя у различных лиц наблюдаются широкие ее колебания (М. Я. Михельсон, 1948; Augustinsson, 1955; А. А. Покровский, 1960). Подробная сводка данных об определяемом при жизни уровне холинэстеразной активности цельной крови и плазмы людей, полученных многочисленными авторами различными методами, приводится в обзорах Augustinsson (1955, 1963), Koelle (1963) и Grob (1963).

Augustinsson (1955) манометрическим методом с использованием бутирилхолина (для плазмы) и ацетил-бета-метилхолина (для эритроцитов) установил, что активность холинэстеразы плазмы у мужчин больше, чем у женщин, и при повторных исследованиях она меняется в пределах ±6%. Что касается активности холинэстера-

зы эритроцитов, то автор не нашел половых различий, а также изменений при повторных исследованиях.

Многими исследователями показано, что активность холинэстеразы зависит от возраста. Так, активность ложной холинэстеразы сыворотки крови новорожденных и детей 1—8-недельного возраста очень высокая. Активность истинной холинэстеразы эритроцитов и печени с возрастом убывает, в то время как активность фермента мозга резко возрастает (до 7—10 дней после рождения).

Имеются многочисленные данные, указывающие на изменения активности холинэстеразы при некоторых патологических состояниях. Давно было обращено внимание на клиническое значение понижения холинэстеразной активности сыворотки крови при заболеваниях печени.

Снижение активности холинэстеразы сыворотки крови особенно выражено при циррозах печени и при хронических гепатитах. Оно обусловлено угнетением осуществляющегося в печени синтеза ложной холинэстеразы. Вот почему степень снижения активности ложной холинэстеразы отражает тяжесть и распространенность поражения печеночных клеток. Это делает холинэстеразную активность удобным критерием количественной оценки протеосинтетической функции печени. Так, по данным А. С. Карпович-Егорьковой (1957), активность холинэстеразы сыворотки здоровых людей составляет 5,0—5,7 микромолей уксусной кислоты, при болезни Боткина в легкой степени —3,0, при средней тяжести —2,2, в тяжелых случаях —1,9. По мнению автора, это проба в известной мере отображает как клиническое течение острого гепатита, так и степень поражения функции печени. У больных механической желтухой, которая не сопровождается значительными нарушениями со стороны паренхимы печени, активность холинэстеразы остается без видимых изменений (А. А. Покровский, 1960).

Снижение холинэстеразной активности крови обнаружено при анемиях, раке, ревматизме, туберкулезе и при других заболеваниях.

Многие авторы наблюдали падение холинэстеразной активности сыворотки при инфекционных болезнях: тифозно-паратифозных заболеваниях, сыпном тифе, полиомиелите, воспалении легких, эпидемическом паротите, специфическом и неспецифическом артрите, плевритах,

перитонитах и газовой гангрене, при действии дифтерийного токсина, дизентерийного токсина, эндотоксина кишечной палочки и при реакции антиген — антитело.

Несомненный интерес представляют данные о снижении активности холинэстеразы крови при инфарктах миокарда. Причины этого явления не ясны, так как возможность синтеза холинэстеразы в миокарде исключается.

По данным большинства авторов, лучевая болезнь сопровождается понижением или волнообразными изменениями активности холинэстеразы. Это было показано Г. Б. Бутенасом (1958) и И. С. Гавриленко (1960).

Однако при некоторых патологических процессах можно наблюдать и повышение активности холинэстеразы, например при гипертонической болезни, экспериментальной гипертонии, язвенной болезни, брюшнотифозной аллергии, после перенесенного анафилактического шока.

Таким образом, при большинстве патологических процессов активность холинэстеразы уменьшается в той или иной степени, увеличиваясь лишь при гипертонии, язвенной болезни и сенсибилизации. Последнее обстоятельство указывает на известное приспособление к меняющемуся ацетилхолиновому метаболизму, поскольку имеются данные, свидетельствующие о повышении при аллергии активности холинацетилазы (М. И. Ундрицов, 1952), фермента, синтезирующего ацетилхолин. Снижение холинэстеразной активности печени и сыворотки крови наблюдается после денервации печени (Р. Н. Шастин, 1961). Видимо, сдвиги в активности ложной холинэстеразы могут в определенной мере зависеть от нарушения иннервационных механизмов. В патогенезе многих патологических процессов (лучевая болезнь, бактерийные интоксикации и инфекции) частично имеет место «функциональная денервация», парабиотическое состояние отдельных участков нервной системы, в результате чего расстраивается трофика с последующим снижением холинэстеразной активности крови. Не исключена возможность в этих случаях и непосредственного повреждения ткани печени токсическими воздействиями (Р. Н. Шастин, 1961). Данные о влиянии различных отделов нервной системы на активность холинэстеразы подкрепляют предположение, что существует некоторая зависимость между функциональным состоянием нервной системы и активностью холинэстеразы.

При черепно-мозговой травме важное значение имеет состояние синапсов центральной нервной системы. Учитывая современные взгляды на роль ацетилхолиновой блокады синапса в механизме парабиоза, можно думать, что под влиянием сверхсильных черепно-мозговых повреждений возникает патологический парабиоз. При тяжелых формах травмы черепа парасимпатическая система (в отличие от симпатической) угнетается, что ведет за собой накопление ацетилхолина в мозгу и спинномозговой жидкости (Б. И. Каменецкая, 1959) и снижение активности холинэстеразы. Глубину парабиотического процесса при острой черепно-мозговой травме, тестируемого не только по снижению активности холинэстеразы в крови (Ш. И. Паволоцкий, 1956; Я. С. Смусин и Г. Д. Образцов, 1964), но и по миографическим данным, ряд авторов склонен объяснять возникновением парабиотических блоков в мионевральных аппаратах. Эти явления, возможно, обусловлены инактивацией холинэстеразы и нарушением кровообращения в головном мозгу.

Определение холинэстеразной активности крови приобретает важное значение в клинике в связи с внедрением в лечебную практику веществ, обладающих курареподобным действием,— дихолиновых эфиров дикарбоновых кислот, а также некоторых антихолинэстеразных препаратов. В хирургической практике широко используется дихолиновый эфир янтарной кислоты — дитилин, сукцинилхолин (Р. С. Рыболовлев, 1953, 1957; П. А. Куприянов, М. Я. Михельсон и А. Л. Мнджоян, 1957; А. Ф. Данилов, 1957). Этот препарат позволяет получить легко управляемое расслабление мышц, необходимое для проведения недлительных операций, а также при операциях на легких и сердце. Кратковременность и возможность регулирования действия дитилина связаны с его быстрым гидролизом холинэстеразой крови. Однако клиническая статистика показывает, что в ряде случаев использование дихолиновых эфиров приводит к неожиданному резкому ухудшению общего состояния, длительному апноэ и даже гибели больного. Осложнения встречаются и при применении антихолинэстеразных веществ для лечения миастении (А. А. Покровский, 1960). Эти обстоятельства не могут не интересовать и судебную медицину в связи с экспертизой так называемых врачебных дел.

Обычно такие осложнения связаны либо с низкой активностью холинэстеразы плазмы (вследствие какой-либо патологии), либо с аномальным строением этого фермента. У некоторых индивидуумов холинэстеразы в плазме много, но она не способна гидролизовать дитилин в силу каких-то, обычно передаваемых по наследству, особенностей строения ее активной поверхности.

Значительно менее освещен в литературе вопрос о физиологической роли и пределах изменений активности истинной холинэстеразы эритроцитов, обусловленных болезнями. Установлено, что истинная холинэстераза находится преимущественно в строме эритроцитов, а при выделении стромина бóльшая часть холинэстеразы переходит из гемолизата во фракцию данного белка.

Понижение холинэстеразной активности стромы эритроцитов отмечено при хронической гемолитической анемии с гемоглобинурией Маркиафа. Предположения о возможности использования определения холинэстеразной активности эритроцитов в качестве функционального теста состояния костного мозга не подтвердились.

Из состояний, связанных с увеличением активности холинэстеразы сыворотки крови, клинический интерес представляет только нефротический синдром. При тяжелых нефрозах содержание холинэстеразы в сыворотке может увеличиваться более чем в 3 раза. Причиной этого увеличения является повышение скорости протеосинтетических процессов в печени, связанных со значительными потерями белков сыворотки крови с мочой. Избирательная потеря мелкодисперсной альбуминовой фракции приводит к накоплению в крови более грубодисперсных глобулиновых фракций.

Литературные данные о состоянии активности холинэстеразы трупной крови человека охватывают незначительное количество наблюдений. К их числу относятся исследования Pribilla (1957) на судебно-медицинском материале. Автор нашел, что при несчастном случае (видимо, речь идет о механических повреждениях.— *Я. С.*), эмболии, асфиксии, отравлении барбитуратами и окисью углерода активность холинэстеразы сыворотки крови лежит в пределах средних величин. Зато значительное снижение активности холинэстеразы сыворотки крови автор наблюдал при отравлениях препаратом Е-605 (паратионом). Для нас представляют интерес ис-

Таблица 3

Активность холинэстеразы сыворотки и эритроцитов крови в случаях скоропостижной смерти

(в микромолях гидролизованного ацетилхолинхлорида в 0,1 мл объекта при 10-минутной инкубации)
(по Г. Я. Пеккеру)

Причина смерти	Число наблюдений	Активность холинэстеразы	
		сыворотки	эритроцитов
Относительная норма	22	2,47±0,18	2,62±0,43
Гипертоническая болезнь, острая сердечно-сосудистая недостаточность	23	5,32±0,33	5,85±0,74
Атеросклероз, острая сердечно-сосудистая недостаточность	9	5,03±0,27	5,72±0,6
Злокачественные новообразования	6	0,47±0,12	0,87±0,28
Фиброзно-кавернозный туберкулез легких, легочное кровотечение	3	2,16±0,19	1,54±0,13
Очаговая пневмония раннего детского возраста	5	1,48±0,32	1,62±0
Полигландулярная недостаточность, острая сердечно-сосудистая недостаточность	1	1,37	0,62

Таблица 4

Активность холинэстеразы сыворотки и эритроцитов крови в случаях насильственной смерти

(в микромолях гидролизованного ацетилхолинхлорида в 0,1 мл объекта при 10-минутной инкубации)
(по Г. Я. Пеккеру)

Причина смерти	Число наблюдений	Активность холинэстеразы	
		сыворотки	эритроцитов
Транспортная травма (несчастный случай)	18	5,82±0,18	5,94±0,44
Падение с высоты (несчастный случай)	10	5,85±0,24	6,02±0,32
Падение с высоты (самоубийство)	3	4,17±0,21	3,23±0,17
Повешение (самоубийство) . . .	25	2,54±0,12	2,68±0,37
Острое отравление алкоголем	8	2,68±0,34	1,12±0,10
Отравление нембуталом	1	4,28	1,10

следования Г. Я. Пеккера (1963) по определению активности холинэстеразы сыворотки и эритроцитов крови трупов людей, умерших насильственной и ненасильственной смертью (табл. 3, 4).

Несмотря на значительные индивидуальные колебания активности фермента, автор находит выраженную характерную закономерность в изменении активности холинэстераз при определенных нозологических формах.

Г. Я. Пеккер считает, что колебания активности холинэстеразы у отдельных людей связаны с индивидуальными особенностями тонуса симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы и состоянием высшей нервной деятельности человека в момент, непосредственно предшествующий наступлению смерти. Автор приходит к выводу, что у практически здоровых лиц изменения активности холинэстеразы главным образом связаны с опосредованной через тонус вегетативной нервной системы реакцией коры больших полушарий и вегетативных нервных центров. Этим определяются, по мнению автора, значительные колебания активности фермента при одном и том же виде смерти, но при различном ее роде (убийство, самоубийство, несчастный случай). Фактический материал, собранный Г. Я. Пеккером. несомненно, представляет большой интерес и может быть использован для установления «нормального» уровня активности холинэстеразы трупной крови. В этом отношении определенный интерес представляют также данные В. А. Наумова (1968).

Мы поставили перед собой задачу установить уровень холинэстеразной активности трупной крови человека в некоторых случаях насильственной и ненасильственной смерти: при скоропостижной смерти от заболеваний сердечно-сосудистой системы (преимущественно гипертоническая болезнь и атеросклероз), при смерти от механической асфиксии, механических повреждениях и при других видах насильственной смерти.

Мы исследовали активность холинэстеразы цельной крови, сыворотки и эритроцитов от 63 трупов. Забор крови производили в день вскрытия трупов (обычно в пределах 1—2 суток после смерти). Кровь брали из полостей сердца или из синусов твердой мозговой оболочки в количестве 10 мл (без сгустков). Часть крови центрифугировали для получения сыворотки. Цельную кровь

и сыворотку разводили дистиллированной водой в 8 раз. Определение активности холинэстеразы производилось биохимическим методом Хестрина. Активность холинэстеразы эритроцитов высчитывали по активности цельной крови и сыворотки, как было описано выше.

Ниже приводятся результаты по определению активности холинэстеразы трупной крови человека в зависимости от причин смерти и от наличия или отсутствия в организме алкоголя (табл. 5).

Таблица 5

Коэффициент активности холинэстеразы (QChE) (в мг/г/час) крови людей, умерших насильственной и ненасильственной смертью

Причина смерти	Кровь цельная	Сыворотка [1]	Эритроциты
Заболевания сердечно-сосудистой системы (отрицательная реакция на алкоголь)	29,3± 2,7	21,8± 2,9	42,3± 3,7
Заболевания сердечно-сосудистой системы (положительная реакция на алкоголь)	23,0± 6,5	(14,6± 6,5)	21,7± 4,7
Механические повреждения (отрицательная реакция на алкоголь)	25,6± 3,7	18,4± 5,2	28,3± 7,1
Механические повреждения (положительная реакция на алкоголь)	35,2± 3,0	27,4± 2,7	39,2± 6,5
Механическая асфиксия (отрицательная реакция на алкоголь)	32,1± 2,4	23,5± 4,7	34,5± 8,2
Механическая асфиксия (положительная реакция на алкоголь)	39,9± 4,6	(21,1± 6,4)	53,4± 4,4
Отравления окисью углерода	35,9± 2,6	21,9± 2,8	53,1± 4,3
Острые отравления алкоголем	29,7± 4,6	30,2± 6,5	33,1± 5,0

[1] В скобках приведены данные об уровне активности холинэстеразы, величина которых статистически недостоверна.

Из табл. 5 видно, что активность холинэстеразы колеблется в значительных пределах: цельной крови — от 23,0±6,5 до 39,9±4,6, сыворотки — от 14,6±6,5 до

30,2±6,5 и эритроцитов — от 21,7±4,7 до 53,4±4,4. Как правило, наибольшей холинэстеразной активностью обладают эритроциты, наименьшей — сыворотка.

Полученные данные не позволяют выявить какой-либо закономерности в уровнях холинэстеразной активности от приведенных выше причин смерти, однако обращает на себя внимание, что при смерти от гипертонической болезни активность холинэстеразы цельной крови, сыворотки и эритроцитов выше, чем при смерти от атеросклероза, что находит подтверждение в имеющихся в литературе сведениях. Нам не удалось выявить какой-либо зависимости между уровнем холинэстеразной активности трупной крови при наличии или отсутствии в организме алкоголя. Вместе с тем полученные нами данные характеризуют уровень холинэстеразной активности трупной крови человека в «норме» и могут быть использованы для диагностики в случаях смерти от отравлений антихолинэстеразными веществами, в особенности антихолинэстеразами необратимого действия.

УРОВЕНЬ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ

В холинергических синапсах наблюдается тесная связь между содержанием холинэстеразы и функцией данной синаптической области (Nachmansohn, 1959). То же самое можно проследить и по отношению к синапсам центральной нервной системы. В табл. 6 и 7 приведены данные Nachmansohn (1939) и Feldberg (1945), характеризующие активность холинэстеразы центральной и периферической нервной системы.

За последние годы появился ряд исследований, посвященных определению уровня холинэстеразной активности органов и тканей животных (Ord и Thompson, 1950, 1952; Paton, 1958, и др.). Подробный обзор этой литературы имеется у Holmstedt (1959) и Koelle (1963). Применяя различные субстраты (ацетилхолин, бензоилхолин, ацетил-бета-метилхолин, бутирилхолин и др.) и используя манометрический метод, авторы установили холинэстеразную активность ряда тканей и распределение фермента в различных отделах центральной нервной системы (см. табл. 6, 7, 8, 9).

Таблица 6

Активность холинэстеразы различных участков центральной нервной системы собаки

(выраженная в миллиграммах ацетилхолина, гидролизованного 100 мг ткани за 1 час) (по Nachmansohn, 1939)

Участок нервной системы	Значение
Белое вещество спинного мозга	0,84; 0,97; 0,46; 0,50
Серое „ „ „	7,1; 8,9; 7,7; 6,2
Белое „ больших полушарий	0,83
Кора больших полушарий	3,0; 3,2
Головка хвостатого ядра	57,0
Чечевичное ядро (быка)	69,5
Мозжечок	12,1
Зрительный бугор	5,5
Передние бугры четверохолмия	13,5
Задние бугры четверохолмия	12,7

Таблица 7

Активность холинэстеразы в различных участках нервной системы

(выраженная в миллиграммах ацетилхолина, гидролизованного 100 мг тщательно измельченной ткани за 1 час) (по Feldberg, 1945)

Объект исследования	Участок нервной системы	Значение
Бык, собака	Белое вещество головного мозга	0,25—0,34
Крыса	Спинной мозг	0,24—0,48
Кошка	Белое вещество спинного мозга	0,6
Человек	Кора	1,2
Собака	Зрительный нерв	1,6
„ бык	Кора	2—3
Электрические рыбы	Центральная нервная система	1—4
Человек	Зрительный бугор	2,7
Бык, собака	„ „	2—5
Кролик	Обонятельная доля	4
Бык	Задние бугры четверохолмия	4
„ крыса	Спинной мозг	5
Крыса	Головной „	1
Человек, собака	Спинной „	6—9
Кролик	Мозжечок	9
„	Спинной мозг	10
„	Головной „	11

Таблица 8

Соотношение холинэстеразной активности тканей крысы

[по отношению к ацетихолинхлориду (Ach), бензоилхолинхлориду (Bch) и ацетил-бета-метилхолинхлориду (Mch)]

(по Thompson, 1950, 1952)

Объект исследования		Активность (мл CO_2 /г/час)		
		Ach	Bch	Mch
Мозг	крысы	5 535	343	4 245
Мышца бедра (четырехглавая)	крысы	231	16	158
Диафрагма	крысы	628	0	342
Надпочечники	крысы	2 540	47	994
Желудок	крысы	1 535	367	309
Печень	крысы	912	212	186
Легкие	крысы	848	215	175
Слюнные железы	крысы	1 589	489	523
Сердце (желудочек)[1]	крысы	3 600	1 050	308
„ (ушко)[1]	крысы	10 780	3 400	930
Слизистая кишки[1]	крысы	6 460	3 255	468
Кожа[1]	крысы	3 030	762	294
Сыворотка	крысы	896	112	235
Серое вещество				
Человек		476	260	204
Кролик		8 340	6 710	1 981
Крыса		6 100	4 555	1 935
Морская свинка		4 370	2 720	1 009
Кошка		2 340	2 295	117
Собака		1 799	1 063	1 173
Белое вещество подкорки				
Человек		275	82	594
Кролик		6 690	2 387	9 084
Крыса		6 525	2 389	3 257
Морская свинка		7 145	1 564	18 925
Кошка		2 350	549	4 550
Собака		328	151	595
Бык		Передние бугры четверохолмия		10—12
Кролик		Задние бугры четверохолмия		12,5
Собака, бык		Сетчатка		13—20
Кошка		Спинной мозг		11—25
Кролик		Передние бугры четверохолмия		25

[1] Активность определялась свыше 0—15 минут.

Продолжение

Объект исследования	Активность (мл CO_2 /г/час)		
	Ach	Bch	Mch
Цыпленок	Головной мозг		25
Бык, собака	Хвостатое ядро		23—57
Человек	Скорлупа чечевичного ядра		46
Бык	Чечевичное ядро		67—72
Кальмар	Головной ганглий		260—465
	Периферическая нервная система		
Собака	Задние корешки		1,4
»	Седалищные нервы		1
»	Передние корешки		2,9
»	Спинальные ганглии		3
»	Симпатические ганглии		11—19
Кошка	Симпатические »		40—80
»	Денервированный симпатический ганглий		20—25

Таблица 9

Соотношение холинэстеразной активности тканей центральной нервной системы собаки

[по отношению к ацетил-бета-метилхолину (Mch) и бензоилхолину (Bch)] (по Paton, 1958)

Исследуемая область	M/CO_2 /10 мин.		Исследуемая область	M/CO_2 /10 мин	
	Mch	Bch		Mch	Bch
Кора:			Гипоталамус	323	358
поле 3 (чувствительное)	150	—	Верхние бугры четверохолмия	932	159
поле 4 (двигательное)	178	42	Нижние бугры четверохолмия	364	184
поле 17 зрительное	107	—	Красное ядро	452	—
			Пирамиды	82	94
поле 51 (обонятельное)	466	91	Мозжечок:	1075	24
			нижняя ножка	295	—
Мозолистое тело	16	27	средняя »	243	50
Обонятельная луковица	197	—	верхняя »	333	90
		76			
Зрительный тракт	86		Спинной мозг:		
» нерв	11	222			
Хвостатое ядро	3 936	360	серое вещество	611	218
Зрительный бугор	409	161	дорсальные столбы	36	27
Коленчатое тело:			передние корешки	149	20
латеральное	230	—			
медиальное	316	—			

Обнаружена высокая активность холинэстеразы в чувствительных и моторных нервных волокнах, а также в тельцах Мейснера и колбах Краузе. Много холинэстеразы было найдено в клетках каротидного клубка артерио-венозных анастомозов, в симпатическом ганглии и в ядрах глии коры больших полушарий головного мозга. Кроме того, истинная холинэстераза была выявлена в моторных бляшках скелетной мускулатуры и в клетках гладких мышц стенки желудочно-кишечного тракта, мочевого пузыря и бронхов (В. В. Португалов и В. А. Яковлев, 1953; Coers, 1954).

В миокарде (Gerebtzoff, 1953; Gotte, 1955; Е. И. Ильина-Какуева, 1958) истинная холинэстераза локализуется в нервных тканях вблизи ганглиозных клеток, внутри постганглионарных волокон и в проводящей системе; в обычных мышечных волокнах истинная холинэстераза не обнаружена. Ложная холинэстераза в нервной ткани миокарда не найдена; в проводящей системе ее мало.

В тканях стенок артерий (в том числе в стенках аорты) больше всего содержится ложной холинэстеразы. В ткани надпочечников истинная холинэстераза сосредоточена в нервных волокнах коркового слоя; мозговое вещество содержит фермент в виде зернистой сетки. Активность холинэстеразы вилочковой железы низка, а с возрастом еще более снижается. Холинэстераза в мышечных волокнах щитовидной железы обнаруживается главным образом в местах контакта волокон с железистой тканью. Слюнные железы также содержат специфическую холинэстеразу, которая распределяется в нервных стволах, в ядрах и цитоплазме, внутри междолевых протоков.

В цитоплазме мегакариоцитов костного мозга и селезенки крысы, мыши и кошки найдено значительное, но варьирующее содержание холинэстеразы. Обнаружен фермент в ростковых центрах фолликулов и эндотелии капилляров. И. С. Гавриленко (1959) установила, что наибольшая активность истинной холинэстеразы в лимфаденоидной ткани определяется в мало- и недифференцированных клеточных элементах: лимфобластах, больших и средних лимфоцитах, ретикулярных и адвентициальных клетках, в эндотелии капилляров и сосудов. Значительное количество фермента имеется в шванновской оболочке нервных стволов.

Распределение холинэстеразы в поджелудочной железе разных животных неодинаково. У собак и морских свинок фермент локализуется в дольках и в просвете канальцев; в стенках канальцев и в клетках Лангерганса холинэстераза не обнаружена. У кроликов, крыс и овец фермент найден в периваскулярных элементах: он изолирован или сгруппирован в небольшие пучки вокруг маленьких артерий и артериол, соответственно их холинергической иннервации.

Исследования активности холинэстеразы головного мозга проводились преимущественно на кошках и крысах (G. Koelle, 1950, 1953, 1963). Наибольшее количество холинэстеразы было обнаружено в моторных нейронах моторных ядер головного мозга, в преганглионарных волокнах автономной системы (включая латеральные спинальные рога и ядра Эдингера — Вестфаля), в нейронах ретикулярной формации; в некоторых четвертичных афферентных волокнах латеральных таламических ядер). В гипоталамической области истинная холинэстераза определяется в некоторых клетках супраоптикальной области, в ядрах паравентрикулярной области и над перекрестом зрительных путей.

В небольшом количестве и непостоянно истинная холинэстераза выявляется в нейронах некоторых коррелятивных центров, а также в нейронах, соединяющих моторную кору с большими клетками красного ядра.

В большинстве клеток фермент располагается в клеточных мембранах и продолжается в дендритах и аксонах. В центральной нервной системе, кроме истинной холинэстеразы, содержится большое количество ложной холинэстеразы. Псевдохолинэстераза присутствует главным образом в проводящих путях белого вещества (Ord и Thompson, 1952) и локализуется в глиальных клетках. Кроме того, ложный фермент обнаруживается вокруг супраоптического ядра IV желудочка в районе паравентрикулярного ядра. Капилляры и другие кровеносные сосуды головного и спинного мозга, как и большинство сосудов других органов, также содержат холинэстеразу.

Гистохимические исследования спинного мозга (Giacobini, Holmstedt, 1958; W. Koelle и G. Koelle, 1959) показывают, что только передние и латеральные рога дают положительную реакцию на истинную холинэстеразу.

Большие моторные нейроны сильно окрашиваются. Спинной мозг содержит также и ложную холинэстеразу.

Установлено, что в коре головного мозга межклеточное вещество глии содержит большое количество холинэстеразы, в мозжечке — в клетках-зернах, вокруг клеток Пуркинье, в двигательных нейронах и нервных волокнах серого вещества.

Распределение холинэстеразы в ганглиях оценивается различно. В первоначальных исследованиях на кошках высокая концентрация истинной холинэстеразы была найдена в холинергических нейронах, в то время как в адренергических и сенсорных волокнах фермент не обнаружен. Впоследствии оказалось, что все нервы верхнего шейного симпатического ганглия кроликов содержат различное количество истинной холинэстеразы (W. Koelle и G. Koelle, 1959). Дальнейшие исследование Koelle (1959, 1963) на кошках, кроликах и обезьянах показали присутствие истинной холинэстеразы в большинстве типов периферических нейронов. В холинергических нейронах концентрация энзима постоянно высока; в адренергических и сенсорных типах нейронов холинэстеразы мало. Нейроны ауэрбаховского сплетения и скопления интерстициальных клеток содержат высокую концентрацию ложной холинэстеразы (W. Koelle и G. Koelle, 1959).

В полосатом теле содержится до 95% истинной холинэстеразы и 5% ложного фермента.

Giacobini (1959) нашел, что активность холинэстеразы широко варьирует не только среди клеток различных типов, но и в отдельных клетках одного типа. Активность истинной холинэстеразы в клетках передних рогов в 3—20 раз выше, чем в клетках парасимпатического ганглия, в 10—20 раз выше, чем в клетках симпатического ганглия, и в 30—70 раз выше, чем в клетках спинального ганглия. Активность фермента варьирует как в теле клетки, так и в аксонах. Ложная холинэстераза найдена в небольшом количестве в некоторых клетках спинального и симпатического ганглиев. Активность дендритов несколько ниже, а активность ядер в 10—100 раз ниже других частей клеток: в ядрышках энзим совсем не определяется. По данным автора, в клетках глии содержится только ложная холинэстераза.

Использование специфических субстратов и ингибиторов показывает, что истинная холинэстераза присутст-

вует в некоторых из клеток симпатических, парасимпатических и спинальных ганглиев и во всех клетках передних рогов.

Из фармакологических исследований вытекает, что истинная холинэстераза локализуется как внутри, так и снаружи клеточных мембран (Koelle и Steiner, 1956).

В литературе имеются отрывочные сведения о состоянии холинэстеразы органов и тканей человека. Наиболее полные данные, характеризующие уровень холинэстеразной активности головного мозга человека, имеются в сводке Ord и Thompson (1952) (табл. 10).

Таблица 10

Соотношение холинэстеразной активности различных областей мозга человека при использовании ацетилхолина
(в микромолях CO_2/г/час) (по Ord и Thompson, 1952)

Области головного мозга	Активность холинэстеразы
Подкорковые узлы и мозжечок	
Чечевичное ядро	24 650
Хвостатое ядро	16 900
Черное вещество	5540
Мозжечок	4540
Зрительный бугор	1620
Красное ядро	1537
Серое вещество	
Пре- и постцентральные извилины	476
Лобная доля	439
Затылочная кора	322
Подкорковое белое вещество	
Пре- и постцентральные извилины	275
Лобная доля	523
Затылочная доля	319

А. П. Мельникова (1965, 1967), используя гистохимический метод, нашла, что в сердце человека наибольшей холинэстеразной активностью обладают интрамуральные нервные ганглии, располагающиеся в области передней и задней стенок правого предсердия, а также нервные проводники. Обнаружена богатая сеть холинергических волокон в субэндокардиальном слое и в самом эндокарде. При инфаркте миокарда в начальном периоде его разви-

тия изменения активности холинэстеразы касаются прежде всего нервных ганглиев: резкое снижение активности холинэстеразы в одних узлах на фоне почти нормальной активности фермента в других узлах. По мере развития морфологической картины инфаркта активность холинэстеразы восстанавливается, свидетельствуя о возможной стадии компенсации. При рубцевании инфаркта холинэстеразная активность нервных ганглиев полностью возвращается к норме. В случае гипертрофии миокарда в субэндокардиальном слое определяется слой мышечных волокон, обладающих повышенной холинэстеразной активностью.

Мы поставили пред собой задачу установить уровень активности холинэстеразы органов и тканей человека в норме и при некоторых встречающихся отравлениях (Я. С. Смусин, 1962—1965).

Если можно говорить об активности холинэстеразы крови человека в норме, т. е. у живых, практически здоровых людей, то, естественно, весьма затруднительно или невозможно установить норму холинэстеразной активности органов и тканей трупов. Судить об уровне холинэстеразной активности органов и тканей трупов людей можно лишь путем сравнения активности при некоторых видах смерти. Трудно сказать, что следует принять за норму. По-видимому, наиболее целесообразно брать такие случаи смерти, в которых можно предполагать отсутствие снижения активности холинэстеразы. Вот почему мы были вынуждены исследовать несколько видов насильственной и ненасильственной смерти и путем сравнения сделать выводы о нормальных уровнях активности холинэстеразы органов и тканей человека.

Из насильственной смерти нами были взяты случаи смерти от механической асфиксии (преимущественно повышение), различных механических повреждений, электротравмы, ожогов тела и пр., а также случаи смерти от отравлений (главным образом довольно часто встречающиеся случаи смерти от острого отравления алкоголем). Из ненасильственной смерти мы изучали случаи скоропостижной смерти от заболеваний сердечно-сосудистой системы (гипертоническая болезнь и атеросклероз). Активность холинэстеразы органов и тканей исследовали в день вскрытия трупов (как правило, в пределах 1—2 суток после смерти).

Мы исследовали активность холинэстеразы миокарда (основание стенки левого желудочка сердца), легких (краевые отделы), печени, поджелудочной железы, щитовидной железы, мышечной ткани (грудная мышца), а также различных отделов центральной нервной системы: коры головного мозга (передняя центральная извилина больших полушарий), головки хвостатого ядра, гипоталамуса (сосковые тела и серый бугор), мозжечка (область зубчатого ядра), продолговатого мозга и спинного мозга (шейный отдел). Активность холинэстеразы определялась биохимическим методом Хестрина. Кусочки органов и тканей брали навесками от 100 до 1500 мг и подвергали тщательному растиранию. Затем растертую ткань разводили дистиллированной водой в 5, 10, 15 и 85 раз (в зависимости от уровня холинэстеразной активности органов или тканей). Дальнейшие исследования проводились так же, как описано выше.

Мы исследовали активность холинэстеразы органов и тканей от 66 трупов. Ниже приводятся результаты наших исследований по изучению активности холинэстеразы органов и тканей трупов людей в зависимости от причины смерти и наличия или отсутствия в организме алкоголя (табл. 11) (об этом см. также у В. А. Наумова, 1968).

АКТИВНОСТЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА, ОПРЕДЕЛЯЕМАЯ В «КУСОЧКЕ НЕРАЗВЕДЕННОЙ ТКАНИ»

В предыдущих разделах были изложены результаты опытов по определению уровня активности холинэстеразы крови, органов и тканей трупов людей, умерших насильственной и ненасильственной смертью. При исследовании крови методом Хестрина (с разведением крови) нам не удалось отметить зависимости уровня активности холинэстеразы от наличия или отсутствия алкоголя в организме. При определении активности холинэстеразы органов и тканей тем же методом были получены результаты, свидетельствующие, что некоторое снижение активности холинэстеразы отмечается в случаях смерти от острого отравления алкоголем, а также в случаях смерти при наличии алкогольной интоксикации. Однако полученные результаты являются не вполне статистически

Таблица 11

Коэффициент активности холинэстеразы (в мг/г/час) органов и тканей трупов людей

Исследуемый материал	Заболевания сердечно-сосудистой системы		Механические повреждения		Механическая асфиксия		Острое отравление алкоголем
Наличие алкоголя	–	+	–	+	–	+	+
Миокард	10,9± 1,7	5,1±1,1	7,3± 1,9	4,7± 0,9	(7,6±4,2)	5,5± 0,7	(4,5±2,6)
Поджелудочная железа	12,1± 2,2	(2,8±1,7)	7,7± 2,1	5,1± 1,4	(9,2±4,2)	3,5± 1,1	5,7±0,8
Щитовидная железа	13,1± 2,7	5,4±10,2	7,2± 1,5	7,7± 1,8	(11,4±2,7)	8,1± 1,0	(6,5±3,2)
Мышцы	20,5± 1,4	25,3± 5,7	20,7± 3,0	21,8± 1,8	(22,3±5,8)	20,5± 2,3	19,1± 1,2
Легкие	20,3± 2,1	19,4± 2,0	20,7± 3,4	15,8± 1,6	18,9± 4,0	22,1± 1,4	17,0± 2,3
Печень	25,7± 3,6	(20,4± 5,4)	19,5± 1,1	19,9± 2,9	(22,6± 6,4)	21,2± 2,3	18,9± 3,0
Кора	15,7± 2,0	(9,3±2,7)	12,7± 2,9	11,5± 2,0	(13,0± 5,0)	11,6± 1,0	11,4± 2,4
Хвостатое ядро	275,8±27,9	246,6±52,7	359,3±23,0	327,5±34,9	446,3±79,6	255,8±27,4	206,9±36,5
Гипоталамус	38,8± 4,1	30,0± 5,3	36,8± 3,6	29,4± 6,2	(38,9±10,3)	30,6± 2,8	24,1± 2,5
Мозжечок	54,4±11,3	43,5± 6,6	56,2±15,4	37,5± 7,2	(58,5±36,2)	29,8± 4,4	41,5± 7,6
Продолговатый мозг	23,8± 2,3	24,9± 2,7	26,4± 1,6	22,8± 2,5	23,8± 1,8	24,0± 1,7	22,2± 2,5
Спинной мозг	15,7± 2,1	15,3± 3,0	14,0± 2,0	16,1± 1,8	16,2± 2,7	16,1± 1,1	12,4± 2,4

Примечание. В скобках приведены данные об уровнях активности холинэстеразы, величина которых статистически недостоверна.

достоверными. Поэтому мы решили попробовать исследовать активность холинэстеразы в «кусочке неразведенной ткани» (Я. С. Смусин, С. А. Астапова и Л. В. Баранова, 1961). Мы исходили из того, что при работе методом «неразведенной ткани» алкоголь в тканях не будет разводиться и тем самым будет оказывать угнетающее влияние на активность холинэстеразы.

Мы исследовали активность холинэстеразы коры головного мозга трупов людей, умерших от различных причин, в том числе от острого отравления алкоголем, что имеет очень важное значение в судебно-медицинской практике. Мы обратили также внимание на возможность изменения активности холинэстеразы в зависимости от наличия или отсутствия алкогольной интоксикации, поскольку подобные состояния весьма часто встречаются при судебно-медицинских исследованиях трупов.

Мы произвели исследование активности холинэстеразы коры головного мозга от 134 трупов людей, умерших насильственной и ненасильственной смертью. Во всех случаях производилось качественное и количественное определение алкоголя в головном мозгу и крови.

Для иллюстрации приводим выписку из протокола опыта № 68 от 8 декабря 1958 г.

Гр-н И., 27 лет, скоропостижно скончался 7 декабря 1958 г. Вскрытие произведено на другой день. Судебно-медицинский диагноз: острое отравление алкоголем. Концентрация алкоголя в головном мозгу 3,3‰, в крови — 3,78‰. Взят кусочек коры головного мозга навеской 340 мг, разделен на 4 части и помещен в раствор ацетилхолина в разведении $1 \cdot 10^{-5}$, приготовленном на растворе Рингера. Через каждый час производилось тестирование на прямой мышце живота лягушки оставшегося неразрушенным ацетилхолина (табл. 12). С помощью графической интерполяции (рис. 19) мы определяли процент разрушения ацетилхолина, затем вычисляли время полураспада ацетилхолина (T_{50}), а по нему — QChE.

При приливании первой пробы (через 60 минут) разрушилось 15% ацетилхолина. Следовательно, T_{50} составит:

60 минут — 15%
X минут — 50%

$$X = \frac{60 \cdot 50}{15} = 200 \text{ минут; и т. д.}$$

Вычисляем среднее T_{50}:

$$T_{50} = \frac{200 + 222 + 225 + 218}{4} = 216 \text{ минут.}$$

Таблица 12

Определение активности холинэстеразы головного мозга трупа гр-на И., 27 лет (в мг/г/час)

№ п/п	Время приливания	Что приливается	Длительность сокращения мышцы (в минутах)	Высота сокращения (в мм)	Время контакта (в минутах)	Процент разрушения ацетилхолина	Время полураспада T_{50} (в минутах)
1	18—20	К $1 \cdot 10^{-6}$	2	105			
2	18—30	К $5 \cdot 10^{-7}$	2	79			
3	18—40	К $2{,}5 \cdot 10^{-7}$	2	44			
4	19—00	I $5 \cdot 10^{-7}$	2	70	60	14	200
5	20—00	II $5 \cdot 10^{-7}$	2	62	120	26	222
6	21—00	III $5 \cdot 10^{-7}$	2	52	180	40	225
7	22—00	IV $5 \cdot 10^{-7}$	2	40	240	56	218
8	22—10	К $5 \cdot 10^{-7}$	2	82			
9	22—10	К $2 \cdot 5—10^{-7}$	2	46			

Примечание. К — контрольная проба; I—IV — опытные пробы.

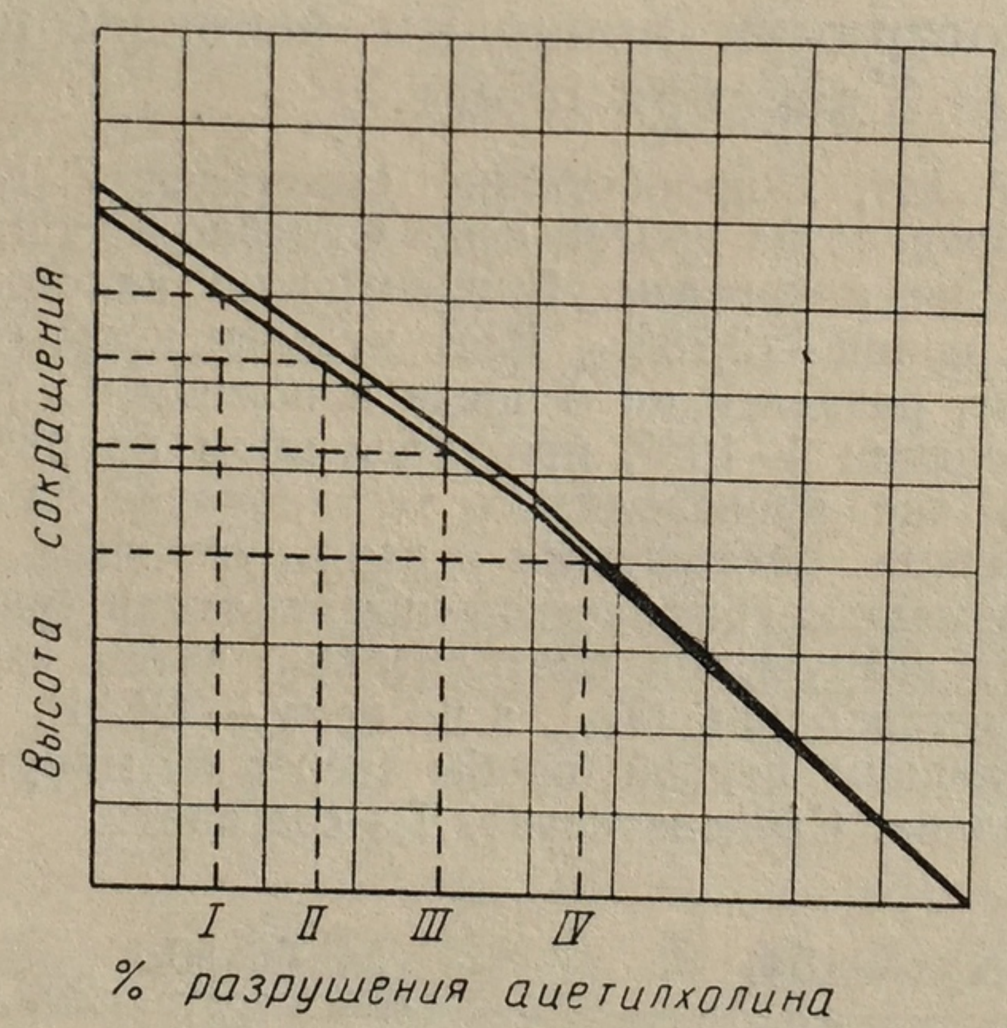


Рис. 19. Определение процента разрушения ацетилхолина с помощью графической интерполяции (объяснение см. в тексте).

Определив среднее T_{50} вычисляем QChE: за 216 минут разрушилось 0,05 мг ацетилхолина (в 10 мл ацетилхолина в разведении

$1 \cdot 10^{-5}$ содержится 0,1 мг ацетилхолина; за 216 минут разрушилась половина ацетилхолина, т. е. 0,05 мг). За 60 минут должно разрушиться X мг ацетилхолина:

$$X = \frac{60 \cdot 0{,}05}{216} = 0{,}014 \text{ мг.}$$

340 мг коры головного мозга, которые были взяты в опыт, разрушили 0,014 мг ацетилхолина. 1000 мг мозга должны разрушить X мг ацетилхолина, откуда

$$X = \frac{1000 \cdot 0{,}014}{340} = 0{,}042 \text{ мг.}$$

Таким образом, QChE составил 0,042 мг/г/час.

Результаты наших опытов по определению активности холинэстеразы коры головного мозга трупов людей в зависимости от причины смерти с учетом содержания алкоголя приведены в табл. 13.

Таблица 13

Коэффициент активности холинэстеразы (QChE) (в мг/г/час) коры головного мозга трупов людей, умерших насильственной и ненасильственной смертью, определяемой в «кусочке неразведенной ткани»

Причина смерти	При отрицательной реакции на алкоголь	Концентрация алкоголя от следов до 2‰	Концентрация алкоголя свыше 2‰
Заболевание сердечно-сосудистой системы	0,133±0,013 0,104÷0,162	0,123±0,012 0,095÷0,151	0,092±0,021 0,043÷0,141
Механические повреждения	0,100±0,013 0,073÷0,127	0,095±0,011 0,072÷0,118	0,093±0,010 0,068÷0,118
Механическая асфиксия	0,104±0,014 0,073÷0,135	0,096±0,011 0,073÷0,123	0,085±0,009 0,056÷0,114
Электротравма	0,126±0,085		
Отравление окисью углерода	0,139±0,011 0,111÷0,167		
Отравление соединениями мышьяка	0,130		
Отравление уксусной кислотой	0,100		
Острое отравление алкоголем			0,072±0,005 0,061÷0,083
Отравление барбитуратами	0,079±0,015 0,031÷0,127		

Таким образом, коэффициент активности холинэстеразы коры больших полушарий головного мозга трупов людей, умерших от заболеваний сердечно-сосудистой си-

стемы, механических повреждений и механической асфиксии (независимо от отсутствия или наличия алкоголя в организме), составил 0,103±0,013 (0,078÷0,128 мг/г/час).

В случаях смерти от острого отравления алкоголем коэффициент активности холинэстеразы равнялся 0,072±±0,005, при смерти от отравлений барбитуратами — 0,079±0,015. Отсюда следует, что при смерти от отравлений антихолинэстеразными веществами обратимого действия наблюдается снижение активности холинэстеразы по сравнению с нормой примерно на 30—50%. Наконец, в случаях смерти от других причин (не от отравлений антихолинэстеразными веществами), но при алкогольной интоксикации отмечалось некоторое снижение активности холинэстеразы, в особенности при высоких концентрациях алкоголя в организме (свыше 2‰), когда активность холинэстеразы снижалась почти до уровней, соответствующих острому отравлению алкоголем. Однако этот вывод статистически является недостоверным.

СОСТОЯНИЕ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ТКАНЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДАВНОСТИ СМЕРТИ

В литературе по этому вопросу имеются лишь единичные указания. Так, Bernsohn и Poseley (1957) показали, что хранение нервной ткани человека при температуре 0—4° в течение 3—5 дней не сопровождается существенной потерей холинэстеразной активности.

Pribilla (1957) колориметрическим методом по Моллендеру определял активность холинэстеразы сыворотки крови людей (как у живых, так и у трупов). Средние изменения pH у живых людей составили: у женщин 0,66±0,148, у мужчин 0,67±0,16; в трупной крови: у женщин 0,68±0,10, у мужчин 0,67±0,14. Автор нашел, что активность холинэстеразы сыворотки трупной крови не подвергается посмертным изменениям и в течение длительного времени (до 72 часов) остается на одном уровне.

Наши исследования (Я. С. Смусин и др., 1958) касались изменений в содержании молочной кислоты, воды, концентрации водородных ионов и активности холинэстеразы мышечной ткани при трупном окоченении. Мате-

риалом для определений явились 156 трупов людей, умерших насильственной и ненасильственной смертью и подвергшихся судебно-медицинскому исследованию.

Мы исследовали икроножную мышцу как наиболее удобный объект. Через разные промежутки после смерти из трупа вырезали кусочки мышечной ткани. Исследование активности холинэстеразы мышечной ткани производилось двумя методами: биологическим методом Платтнера и гистохимическим методом Келле и Фриденвальда.

Результаты исследований методом Платтнера активности холинэстеразы мышечной ткани трупов людей в зависимости от давности наступления смерти и ее причины приведены в табл. 14.

Таблица 14

Активность холинэстеразы (в мг/г/час) мышечной ткани трупов людей в зависимости от давности и причины смерти

Причина смерти	Давность наступления смерти (в часах)			
	12	24	48	72
Сердечно-сосудистые заболевания	8,2± 0,9 6,1÷10,3	8,8± 0,5 7,8÷ 9,8	9,5± 0,5 8,3÷10,5	10,6± 1,3 6,5÷14,7
Механическая асфиксия	8,6± 0,8 5,2÷12,0	9,5± 0,9 7,4÷11,6	10,3± 0,9 8,2÷12,4	12,1± 0,8 9,9÷14,3
Механические повреждения	9,0± 0,4 7,9÷10,9	11,2± 0,9 9,1÷13,3	12,0± 2,1 3,0÷21,0	10,5± 2,4 0,2÷20,8
Отравление окисью углерода			13,7	
Отравление этиловым алкоголем		11,8	12,9	
Отравление уксусной кислотой		9,9		
Отравление соляной кислотой		10,7		
Отравление люминалом	6,9			
Отравление вероналом			6,9	
Отравление ацетоном		5,8		

Из табл. 14 видно, что коэффициет активности холинэстеразы мышечной ткани в пределах до 3 суток после смерти не уменьшается и является величиной более или менее постоянной. Мы не нашли каких-либо существенных различий в уровне холинэстеразной активности мышечной ткани в зависимости от причины смерти, если она наступила не от отравлений веществами, способными вызывать снижение активности фермента. При смерти от отравлений люминалом, вероналом и ацетоном наблюдалось значительное снижение активности холинэстеразы (почти на 50%).

Что же касается отравления алкоголем, то не было отмечено снижения активности холинэстеразы. Возможно, это объясняется разведением алкоголя в исследуемой ткани, что связано с методикой определения активности холинэстеразы по Платтнеру.

Гистохимическим методом была исследована активность холинэстеразы мышечной ткани в 136 случаях. При этом выяснилось, что активность холинэстеразы хорошо определяется во всех исследованных случаях (в пределах 3—4 суток наших наблюдений). При смерти от отравлений люминалом, вероналом, ацетоном, а также алкоголем отмечалось угнетение активности холинэстеразы — интенсивность окраски ткани при ее обработке ацетилтиохолином была значительно слабее, чем при смерти от других причин. Угнетение активности холинэстеразы при смертельном отравлении алкоголем, видимо, характеризует истинную картину состояния фермента, так как гистохимический метод не сопровождается гомогенизацией и разведением исследуемой ткани. На рис. 20 приведены микрофотограммы, характеризующие активность холинэстеразы мышечной ткани в «норме» и при смерти от некоторых отравлений.

Итак, активность холинэстеразы после смерти имеет более или менее постоянную величину. В связи с этим представлял значительный интерес вопрос о содержании молочной кислоты, воды и концентрации водородных ионов в мышечной ткани. Эти факторы, судя по литературным данным, влияют на степень выраженности трупного окоченения. Кроме того, они могут оказать влияние на уровень активности холинэстеразы тканей после смерти. Вот почему в тех же объектах, в которых определялась активность холинэстеразы, мы попытались просле-

дить за уровнем содержания молочной кислоты, воды и концентрации водородных ионов.

Наши исследования показали, что посмертно (в пределах 3 суток наблюдений) содержание молочной кислоты, воды и концентрация водородных ионов остаются преимущественно на одном уровне и практически не оказывают влияния на течение трупного окоченения.

В 1958 г. Moor и Petty опубликовали материалы по изучению остаточной активности холинэстеразы методом

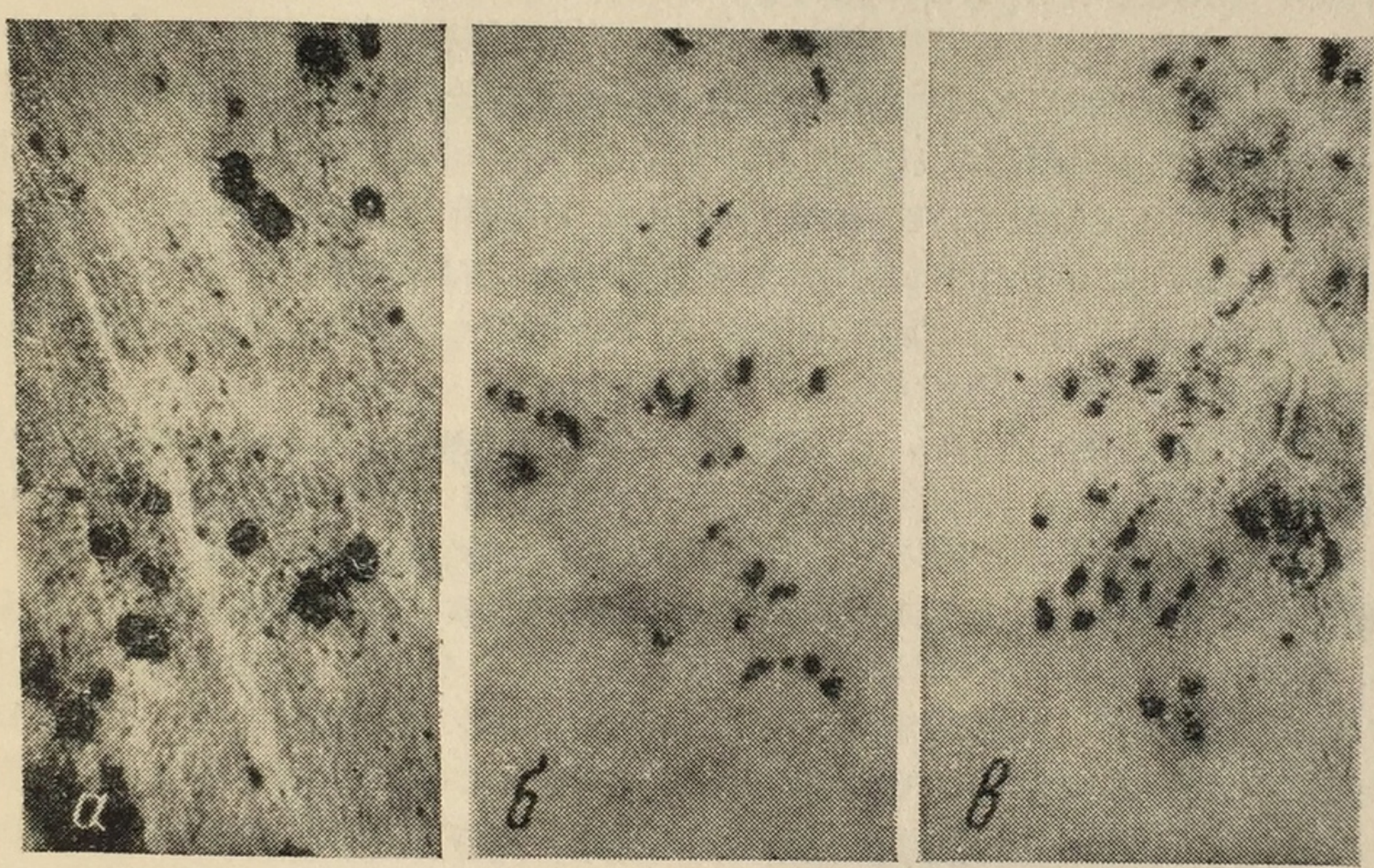


Рис. 20. Икроножная мышца трупов людей.
а — скоропостижная смерть от сердечно-сосудистых заболеваний (контроль); *б* — смерть от острого отравления алкоголем: холинэстераза угнетена (интенсивность окраски значительно менее выражена по сравнению с контролем); *в* — смерть от отравления люминалом: холинэстераза угнетена (интенсивность окраски значительно менее выражена по сравнению с контролем). Ок. 5, об. 8. Фотографирование произведено при одинаковых условиях.

Келле — Гомори в модификации Бергнера в моторных бляшках межреберных мышц человека и животных — крыс, морских свинок и кроликов (здоровых и отравленных ингибиторами холинэстеразы — ДФФ, тетраэтилпирофосфатом). Авторы также исследовали влияние фиксации материала на активность холинэстеразы. После фиксации мышц 10% раствором формалина в фосфатном буфере при pH 7,0 холинэстераза в моторных бляшках у человека сохранялась до 10 суток, у крыс — до 13 суток. Фиксация холодным ацетоном дала лучшие резуль-

таты: холинэстераза у человека выявлялась до 35 дней, у крыс — до 13 дней. Хранившиеся при 4—6° мышцы человека сохраняли активность фермента 157 дней, мышцы крыс — 120 дней. Авторы нашли, что хранение мышц при комнатной температуре приводило к потере активности холинэстеразы в течение 3 дней. В бальзамированных мышцах активность фермента сохранялась 150 дней.

Интересные данные были получены Г. Я. Пеккером (1961) по определению холинэстеразной активности сыворотки крови и эритроцитов собак в зависимости от давности наступления смерти. Автор показал, что в пределах 72 часов после наступления смерти при отсутствии выраженного гемолиза практически не происходит изменений активности сывороточной холинэстеразы и холинэстеразы эритроцитов по сравнению с показателями прижизненного определения в пробах крови, взятых непосредственно перед забоем животного.

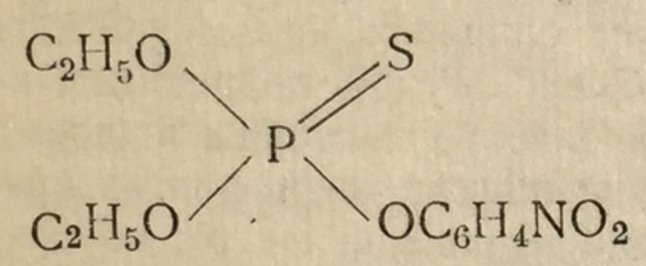
Таким образом, проведенные нами исследования холинэстеразной активности мышечной ткани трупов людей и известные из литературы данные свидетельствуют, что активность холинэстеразы в пределах 3 суток после смерти практически остается стабильной и соответствует прижизненному состоянию активности фермента. Видимо, снижение холинэстеразной активности тканей наступает по мере разложения (гниения) трупов. Следовательно, определение уровня активности холинэстеразы органов и тканей людей, характеризующее прижизненное состояние холинэстеразы организма, может быть использовано для диагностики отравлений веществами, оказывающими влияние на активность холинэстразы. Если к тому же учесть, что бóльшая часть ядовитых инсектицидов и других антихолинэстераз, которые могут быть причиной смерти, угнетает холинэстеразу необратимо, то становится совершенно очевидным, что это обстоятельство дает возможность очень точно определять активность холинэстераз в различных тканях трупа даже через длительные сроки после смерти.

Глава IV

ОТРАВЛЕНИЯ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ НЕОБРАТИМОГО ДЕЙСТВИЯ И ИХ ПОСМЕРТНАЯ ДИАГНОСТИКА

В настоящей главе рассматриваются вопросы, касающиеся посмертной диагностики отравлений некоторыми фосфорорганическими соединениями, обладающими способностью вызывать необратимое угнетение холинэстеразы. Одни из этих веществ используются или предложены в настоящее время в виде лекарств, другие нашли практическое применение в качестве сельскохозяйственных инсектицидов.

Отравление тиофосом. Тиофос (НИУИФ-100, паратион, Е-605) представляет собой 0,0-диэтил-0-4-нитрофенилтиофосфат:



Молекулярный вес 291,26

Это бесцветная маслянистая жидкость со слабым запахом. Температура плавления 6,1°, температура кипения 160° (при 1 мм рт. ст.). Растворимость в воде 0,002% (25°). Смешивается со спиртом, ацетоном, четыреххлористым углеродом, хлороформом, эфиром, толуолом, диоксаном. Технический препарат выпускается в виде 30% концентрата эмульсии, из которого готовят 0,03—0,05% водные растворы, или в виде 1% дуста; разлагается на свету, гидролизуется водой медленно.

Тиофос относится к числу сильнодействующих веществ: средняя смертельная доза при введении через рот для белых мышей составляет 9—25 мг/кг, для белых крыс — 6—16 мг/кг. В дозе 2 мг/кг вызывает бронхоспазм у кошки на 40% от возможного (И. В. Семенов, 1958). В экспериментах на животных Е. И. Спыну (1957) наблюдала угнетение, а затем двигательное возбуждение, не-

правильное учащенное дыхание, слезотечение, слюнотечение, фибриллярное подергивание отдельных мышечных групп, нарушение координации движений, атаксию, клонические и тонические судороги, непроизвольное мочеиспускание, паралич дыхания. На секции животных, погибших от отравления тиофосом, автор наблюдал полнокровие внутренних органов и отек легких и мозга. При гистологическом исследовании отмечены полнокровие и отек легких, спазм бронхов, кровоизлияния вокруг сосудов и бронхов, в миокарде и печени — расширение сосудов, кровоизлияния, дистрофические изменения, в почках клубочки и извитые канальцы переполнены кровью, определяется мутное набухание эпителия канальцев, иногда явления гломерулонефрита.

О случаях отравлений людей тиофосом, в том числе со смертельным исходом, имеются многочисленные сообщения (Grob и др., 1950; Abrams и др., 1950; М. А. Казакевич, 1954; А. М. Бухмастова и Я. С. Смусин, 1963; О. Б. Мазикова, 1963, и др.). Отравления тиофосом по сравнению с другими фосфорорганическими соединениями встречаются наиболее часто.

Petersohn (1965) приводит 4 случая смертельных отравлений тиофосом (препарат Е-605). В первом случае с целью убийства препарат был впрыснут в вафли (подобный случай встретился в нашей практике, когда тиофос был введен вместо начинки в шоколадную конфету). Во втором случае с целью убийства из порошка препарата были изготовлены зеленоватые пилюли, похожие на те, которые принимал пострадавший с лечебной целью. В третьем случае препарат был подмешан к зубной пасте, находящейся в тюбике. В четвертом случае с целью самоубийства препарат был введен с помощью шприца внутримышечно в область левого соска (аналогичный случай наблюдался в нашей практике: с целью убийства фосфорорганический препарат был введен внутримышечно).

Клиника острых отравлений тиофосом характеризуется признаками возбуждения холинергического отдела нервной системы. При легкой форме отравления отмечаются жалобы на общую слабость, быструю утомляемость, нарушение сна, головокружения, повышенную потливость, усиленное слюнотечение. Наблюдаются вялая реакция зрачков, непостоянный нистагм, гипергидроз, гипертермия по утрам (синдром астенического состояния с признаками дисфункции вегетативной нервной системы). При средней тяжести отравлений отмечаются головокружения, беспокойство, рвота, понос, боли в животе, расстройства зре-

ния, общая слабость, миоз, вялая реакция зрачков, горизонтальный нистагм, бедность мимики, маскообразное лицо, монотонность речи, неуверенная походка, атаксия, дрожание рук, головы, понижение сухожильных рефлексов, иногда арефлексия (синдромы диффузного поражения центральной нервной системы с преимущественным поражением диэнцефально-стволовых отделов мозга); иногда бывают астматические состояния с обилием сухих и влажных хрипов при аускультации.

При тяжелых формах отравления наблюдаются клонико-тонические судороги, кома с глубокой потерей сознания и нарушением со стороны сфинктеров, дыхание типа Чейн-Стокса, отек легких, иногда эпилептиформные припадки (М. А. Казакевич, 1954). При больших количествах яда смерть может наступить в течение 1—2 часов.

В случае благоприятного исхода тяжелого отравления выздоровление наступает в среднем через 25 часов, менее тяжелого — через 12 часов. Еще в течение 2—3 суток отмечаются головокружения, бессонница, головная боль, понижение аппетита и общая слабость. Эти явления обычно возникают, когда активность холинэстеразы крови снижена на 50—70%, но отдельные симптомы выявляются и при сравнительно небольшом угнетении холинэстеразы (Л. И. Медведь, 1965).

При исследовании трупов лиц, погибших от отравления тиофосом, обычно находят отек легких и мозговых оболочек, небольшое увеличение селезенки, полнокровие почек и мозговых оболочек, точечные кровоизлияния в белом и сером веществе мозга, значительное расширение периваскулярных пространств в нервной ткани (особенно в подкорковой области), изменения пирамидальных клеток с разрывами отростков нервных клеток.

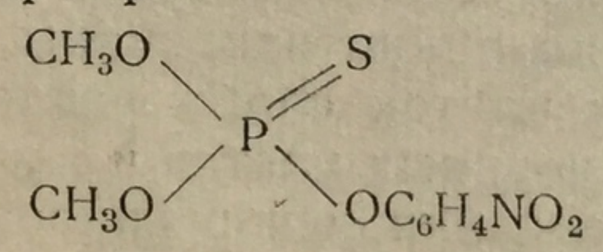
Подробное описание гистологической картины внутренних органов при смертельном отравлении людей тиофосом дано О. Б. Мазиковой (1963). Автором обнаружены резкий отек и полнокровие мягкой мозговой оболочки с небольшими кровоизлияниями, в мозгу — резкое расширение и полнокровие капилляров и мелких вен, стазы, периваскулярные кровоизлияния; стенки сосудов разрыхлены, ядра эндотелия частично пикнотизированы, белое вещество разрежено, контуры клеток слабо различимы, ядра бледно окрашены, часть нервных клеток и глии пикнотизирована. В сердце поперечная исчерченность мы-

шечных волокон иногда едва различима, контуры волокон нечеткие, ядра набухшие, слабо окрашены, иногда пикнотизированы; определяются фрагментация мышечных волокон, отечность межмышечной соединительной ткани с кровоизлияниями. В легких — местами отек, участки эмфиземы, полнокровие сосудов, иногда значительные кровоизлияния, бронхиальный эпителий почти полностью слущен, стенки бронхов разрыхлены. В печени контуры клеток слабо различимы, ядра бледные, протоплазма имеет пенистый вид, внутридольковые капилляры и пространства Диссе резко расширены, вокруг междольковых сосудов, желчных протоков и внутри печеночных долек и в окружности крупных вен — круглоклеточные инфильтраты различных размеров, состоящие из лимфоидных клеток, небольшого количества плазматических клеток и отдельных эозинофилов.

В почках часть клубочков увеличена, капилляры их расширены, полнокровны, в просвете отдельных капсул выщелоченные эритроциты и немного белковой жидкости, эпителий большинства извитых канальцев с распадом протоплазмы на отдельные глыбки, ядра отсутствуют или слабо окрашены, во многих канальцах клетки разрушены полностью, часть прямых канальцев некротизирована, небольшой отек стромы, резкое расширение и кровенаполнение сосудов коркового и мозгового слоев. Слизистая желудка сильно истончена, местами почти полностью отсутствует, местами видно небольшое количество желез с мутной протоплазмой, с распадом ее на отдельные глыбки и с бледным ядром; местами определяются круглоклеточные инфильтраты, нередко слизистая и подслизистая оболочки отечны, с кровоизлияниями.

Таким образом, описанная выше картина характеризует резкое расстройство кровообращения с дистрофическими изменениями в сердце, печени и легких и особенно в почках и в желудке, где они приобретают некротический характер.

Отравление метафосом. Метафос (метилпаратион, вофатокс) представляет собой 0,0-диметил-0-4-нитрофенилтиофосфат:



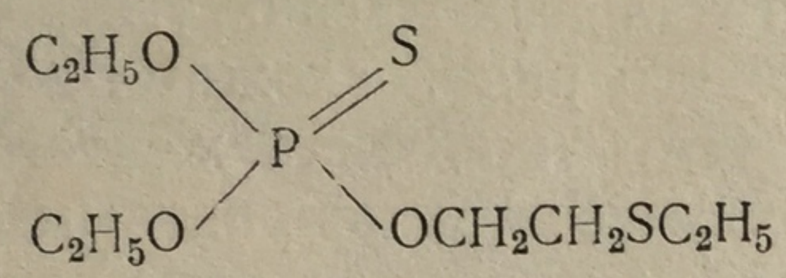
Молекулярный вес 263,21

Метафос — белое кристаллическое вещество с температурой плавления 36—36,5° и температурой кипения 158° (при 2 мм рт. ст.). Нерастворим в воде, плохо — в нефтепродуктах, хорошо — в растительных маслах, углеводородах жирного и ароматического ряда, сложных эфирах, кетонах. Технический препарат — жидкость желтого или коричневого цвета, со специфическим неприятным запахом, выпускается в виде 2,5% дуста или в виде концентрата, содержащего 25% метафоса и 75% эмульгатора ОП-7.

Метафос относится к высокотоксичным препаратам, действует сходно с тиофосом, но слабее его. По данным И. Т. Брахновой (1959), при введении через рот для белых мышей средняя смертельная доза составляет 30—50 мг/кг, для белых крыс — 15—25 мг/кг, для кроликов — 100 мг/кг. При нанесении на кожу 100—180 мг/кг технического препарата погибает 50% кроликов. В опытах на животных при отравлении отмечались слюнотечение, учащенное дыхание, миоз, тремор, клонико-тонические судороги, нарушение функции сфинктеров, при хроническом отравлении — угнетение, вялость, адинамия, потеря аппетита. При 4-часовом воздействии концентрации 0,024 мг/л активность холинэстеразы сыворотки у кошек снижалась в 2 раза. Помимо снижения холинэстеразной активности крови, И. Т. Брахнова отмечала изменения в картине крови: уменьшение содержания гемоглобина и эритроцитов, ускорение РОЭ, нейтрофильный лейкоцитоз со значительным сдвигом лейкоцитарной формулы влево, с появлением юных клеток, повышенное содержание метгемоглобина (за счет наличия в структуре метафоса остатка паранитрофенола). При исследовании погибших животных автор нашел в сердце, печени, почках и легких изменения воспалительного и дегенеративного характера, дистрофические изменения в нервных клетках головного мозга (коры и подкорковых ядер).

Концентрация дуста метафоса порядка тысячных миллиграмма на 1 л вызывала у людей в течение нескольких дней снижение активности холинэстеразы. Ф. Сарваш (1961) при легком отравлении у людей наблюдал головокружение, тошноту, рвоту, понос, схваткообразные боли в животе, общее недомогание, чувствительность нижнего края печени, повышенное содержание уробилиногена в моче и трансаминазы в сыворотке крови.

Отравление меркаптофосом. Меркаптофос (систокс, деметон, внуран, Е-1059) представляет собой этилмеркаптоэтилтиофосфат:



Молекулярный вес 258,0

Меркаптофос — бесцветная жидкость. Технический препарат — густая маслянистая жидкость коричнового цвета с резким неприятным запахом. Выпускается в виде эмульсии, содержащей от 0,2 до 0,5% концентрата препарата. Концентрат содержит 30% действующего начала и 70% эмульгатора ОП-7.

Меркаптофос токсикологически подробно изучен Ю. С. Каганом (1957, 1959—1963). Средняя смертельная доза при введении через рот для белых мышей составляет 8 мг/кг, для белых крыс — 4 мг/кг. При затравке животных отмечаются вялость, уменьшение подвижности, сменяющееся сильным двигательным возбуждением. Далее развиваются атаксия, фибриллярные подергивания мышц всего тела, тремор, клонические судороги, коматозное состояние. На секции животных, погибших от отравления меркаптофосом, наблюдаются дистрофия нервных клеток головного мозга; мутное набухание и резко выраженное венозное полнокровие миокарда; полнокровие, мутное набухание клеток и пикноз ядер печени; в почках — расширение просвета извитых канальцев, набухание эпителия, растворение ядер; в легких — резкое расширение сосудов перегородок с явлениями стаза.

Т. М. Эфендиев (1961) описал случаи острых отравлений людей меркаптофосом. При отравлениях в легкой форме отмечаются общая слабость, головная боль, головокружения, тошнота, рвота, сонливость, брадикардия, артериальная гипотония, приглушенность тонов сердца, сухие и единичные влажные хрипы в легких, болезненность в подложечной области, явления метеоризма, незначительный нейтрофильный лейкоцитоз. При отравлении средней тяжести наблюдаются депрессия, апатия, жалобы на интенсивные боли в височных областях, подергивания мышц конечностей и лица, монотонная речь, резко выраженная артериальная гипотония, иногда — пневмонические очаги, признаки дистрофии миокарда (уве-

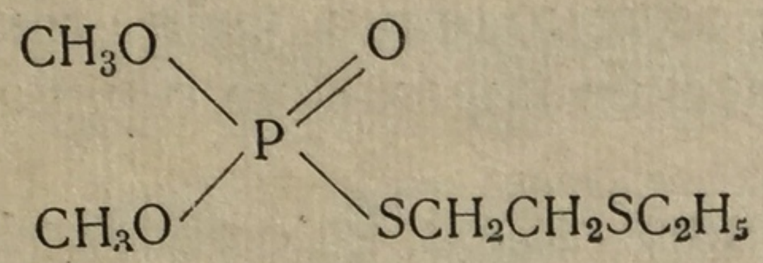
личение размеров сердечной тупости влево, глухость тонов, систолический шум у верхушки, увеличение печени и чувствительность ее нижнего края, альбуминурия и микрогематурия, эритроцитоз и выраженный лейкоцитоз — 15 000 — 20 000, ускорение РОЭ). В тяжелых случаях отравления появляются неукротимая рвота, непроизвольное мочеиспускание и дефекация, судороги мышц конечностей, миоз с последующим мидриазом, вялая реакция зрачков, расстройства аккомодации, чейн-стоксово дыхание, отек легких, токсическое поражение сердца, печени и почек.

Сходную картину отравления людей, но с волнообразным течением болезни (чередование тяжелого состояния с периодами улучшения) наблюдали И. С. Фаерман и др. (1961). В. А. Крючкова (1959) при отравлении людей отмечала головную боль, тошноту, рвоту, общую слабость, мидриаз, побледнение кожных покровов и слизистых, анизорефлексию, затемнение сознания, токсический отек легких, повторную рвоту, частый жидкий стул, общие судороги, исчезновение эозинофилов, лимфопению, сдвиг лейкоцитарной формулы влево. При исследовании трупов людей, погибших от отравления меркаптофосом, находили кровоизлияния в мозг, под плеврой и эпикардом, в слизистую желудочно-кишечного тракта, явления резкой дистрофии печени, поджелудочной железы и надпочечников.

И. Я. Сосновик (1959) описал клинику хронического отравления людей меркаптофосом: упорные головные боли, головокружения, ослабление памяти, нарушения сна, слабость в конечностях, ухудшение аппетита, тошнота, дезориентация с затемнением сознания, понижение корнеальных рефлексов, появление нистагма, сглаженность носогубной складки, отклонение языка, тремор. На электроэнцефалограммах определяются очаги застойного возбуждения в височных отделах головного мозга, понижение корковой активности и угнетение альфа-ритма, понижение электрической активности коры в лобно-затылочном и височно-затылочном отведениях, появление патологических дельта-волн, ареактивность коры при случайных раздражениях. Изменения в картине крови: повышение содержания эритроцитов при малоизмененном показателе гемоглобина, склонность к лейкопении, сдвиг лейкоцитарной формулы влево, токсическая зер-

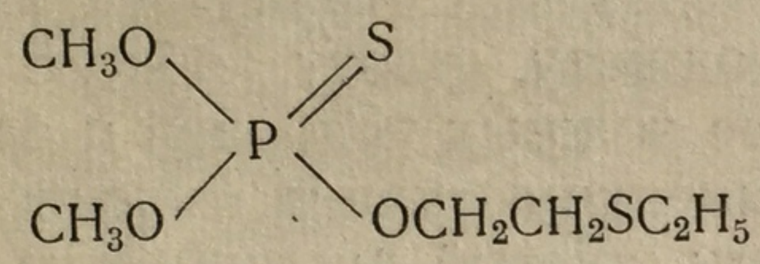
нистость нейтрофилов, замедление РОЭ. Эти изменения крови (наряду со снижением активности холинэстеразы) выявляются еще до развития неврологических нарушений.

Отравление метилмеркаптофосом. Метилмеркаптофос (метилсистокс, метасистокс, метилдеметон) представляет собой смесь 0,0-диметил-S-этилмеркаптоэтилтиофосфата (тиоловый изомер):



Молекулярный вес 230,28

и 0,0-диметил-0-этилмеркаптоэтилтиофосфата (тионовый изомер):



Молекулярный вес 230,28

Метилмеркаптофос — бесцветная жидкость с неприятным запахом. Тионовый изомер имеет температуру кипения 90° (при 0,4 мм рт. ст.), растворимость в воде 0,01%; тиоловый изомер — соответственно 102° (при 0,4 мм рт. ст.) и 0,33%. Тионовый изомер при комнатной температуре постепенно изомеризуется в тиоловый. Применяется в виде концентрата, содержащего 30% суммы тиолового и тионового изомеров и 70% эмульгатора ОП-7.

Метилмеркаптофос относится к высокотоксичным препаратам. Н. К. Стацек (1959) нашел, что при введении через рот белым мышам метилмеркаптофоса средняя смертельная доза составляет 46—70 мг/кг, белым крысам — 55—138 мг/кг, кошкам —30—50 мг/кг. Смертельные дозы при нанесении на кожу кроликов составляют 75—100 мг/кг. Препарат обладает кумулятивным свойством.

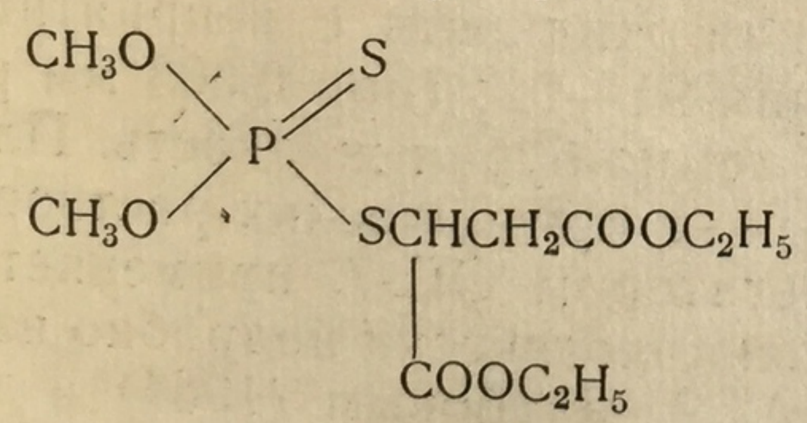
Клиника отравления метилмеркаптофосом такая же, как при отравлении тиофосом, но преобладают явления угнетения нервной системы.

Н. К. Стацек подробно изучал токсические свойства метилмеркаптофоса. При отравлении животных он наблюдал одышку, слюнотечение, слезотечение, двигательное возбуждение, нарушение координаций движений, фибриллярные подергивания мышц, тремор, приступы

клонических судорог. Угнетение активности холинэстеразы определялось даже при отсутствии клинических симптомов. При наличии клинических симптомов активность холинэстеразы оказывалась угнетенной на 60—80%. В крови отмечаются повышенное содержание гемоглобина, эритроцитоз, нейтрофильный лейкоцитоз, лимфопения и эозинопения. Наблюдается также понижение условнорефлекторной деятельности. На секции животных обнаруживали полнокровие оболочек и вещества мозга, дистрофические изменения нервных клеток коры, мозжечка, продолговатого мозга, зернистую или жировую дистрофию, а иногда очаги некробиоза в паренхиматозных органах, набухание и разрыхление стенок сосудов, десквамацию эндотелиальных клеток, периваскулиты.

У людей, работавших с метилмеркаптофосом, наблюдались слабость, легкая тошнота, головокружение, головная боль, сонливость, вялость, нарушение зрения, брадикардия, повышение, а затем понижение кровяного давления, приглушение тонов сердца, слюнотечение, болезненность в области живота, при более тяжелом отравлении — понос, угнетение, сонливость, подергивание мышц лица и конечностей, сужение (иногда расширение) зрачков, нарушение дыхания, судороги.

Отравление карбофосом. Карбофос (малатон, малатион) представляет собой 0,0-диметил-S-1,2-дикарбоэтоксиэтилдитиофосфат:



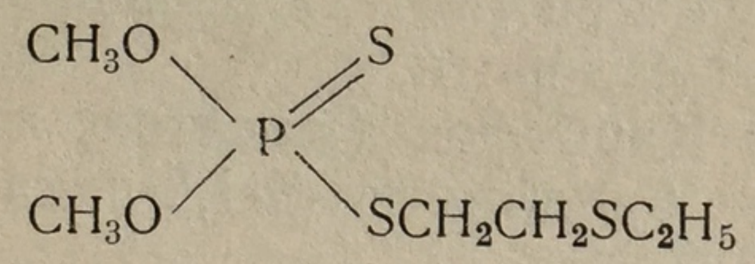
Молекулярный вес 330,35

Карбофос — бесцветная маслянистая жидкость с неприятным запахом. Температура кипения 160—170° (при 3,5 мм рт. ст.). Нерастворим в воде, но хорошо растворяется в бензоле, толуоле, ацетоне и других органических растворителях. Технический препарат — темно-бурая жидкость; концентрат, входящий в состав эмульсии, содержит 35% действующего начала и 65% эмульгатора ОП-7.

По данным Ю. С. Кагана (1963), средняя смертельная доза для белых мышей при введении через рот составляет

400—930 мг/кг, для белых крыс —450—1400 мг/кг, для кошек — 400 мг/кг и выше, при нанесении на кожу кроликов — 4000—6150 мг/кг. После введения смертельной дозы кошкам через 40—60 минут наблюдались угнетение активности холинэстеразы, двигательное возбуждение, слюнотечение, рвота, дрожание, клонические судороги, частое поверхностное дыхание. На секции животных отмечалось полнокровие мозга, легких, сердца, почек, печени, селезенки. При гистологическом исследовании внутренних органов обнаружены дегенеративные изменения, множественные мелкоочаговые кровоизлияния, иногда межуточная пневмония, очаги ателектаза в легких, в печени — изменения по типу мускатной печени, в почках — дегенеративные изменения, иногда экстракапиллярный гломерулонефрит, в мозгу — венозное полнокровие, периваскулярный отек, единичные мелкоочаговые кровоизлияния. Токсические явления по сравнению с тиофосом и метафосом менее выражены и появляются медленнее.

Отравление препаратом М-81. Препарат М-81 (интратион, экатин) представляет собой 0,0-диметил-S-этилмеркаптоэтилдитиофосфат:



Молекулярный вес 246,35

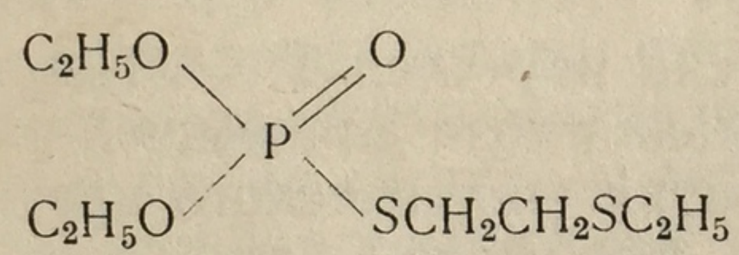
Это бесцветная прозрачная жидкость с неприятным запахом. Температура кипения 91—92° (при 0,003 мм рт. ст.). Технический продукт — темно-бурая жидкость. Плохо растворим в воде, хорошо — в органических растворителях. Смешивается с эмульгатором ОП-7, применяется в виде водных эмульсий. Токсикологически подробно изучен Ю. С. Каганом (1963), А. Я. Якубовым (1964) и др. При отравлении животные вначале несколько угнетены, затем у них появляются одышка, слюнотечение, миоз, понос, мышечные подергивания и дрожание. После кратковременных судорог наступает смерть. Средняя смертельная доза для белых мышей при введении через рот составляет 37 мг/кг, для белых крыс 75 мг/кг, для кошек 20 мг/кг; при нанесении на кожу кроликов средняя смертельная доза равна 75—100 мг/кг.

При вскрытии животных отмечается полнокровие внутренних органов и головного мозга. Гистологически

определяются нарушение кровообращения в виде стазов и тромбозов и признаки поражения сосудистой системы: набухание стенок, дистрофические изменения эндотелия, периваскулярный отек, очаговые кровоизлияния, в центральной нервной системе — дистрофические изменения в виде набухания ядер, хроматолиза, кариолиза и сморщивания клеток, в печени, почках, миокарде — паренхиматозная дистрофия клеток, иногда очаги некробиоза.

Отравление препаратом М-81 проявляется в виде головной боли, тошноты, рвоты, болей в животе, частом жидком стуле, тенезмах, брадикардии (или тахикардии), иногда — экстрасистолии, артериальной гипотонии. Отмечаются потоотделение, саливация, фибриллярные подергивания мышц лица, шеи, иногда всего тела, частое поверхностное дыхание, бронхоспазм, бессонница или сонливость. В тяжелых случаях — спутанность сознания, атаксия, дезориентация, нарушения речи, лейкоцитоз (до 15 000 — 20 000). Активность холинэстеразы снижалась на 50—70%.

Отравление препаратом М-74. Препарат М-74 (дитиосистокс, дисистон) представляет собой 0,0-диэтилмеркаптоэтилдитиофосфат:



Молекулярный вес 274,0

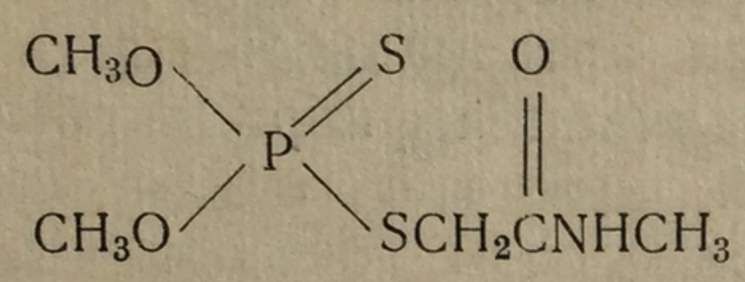
Препарат М-74 — бесцветная прозрачная жидкость с неприятным запахом. Температура кипения 125—126° (при 2 мм рт. ст.). Технический препарат — темно-бурая жидкость. Плохо растворим в воде, хорошо — в органических растворителях, смешивается с эмульгатором ОП-7.

Токсическое действие сходно с меркаптофосом, но более выражено. При введении отмечаются угнетение, одышка, слюнотечение, мышечное подергивание, тремор, миоз, понос. Средняя смертельная доза при введении в желудок составляет для белых крыс 3,4 мг/кг, для белых мышей — 4,8 мг/кг (Ю. С. Каган, 1960). Активность холинэстеразы эритроцитов и плазмы понижается уже при воздействии паров в концентрации 0,0006—0,001 мг/л.

Препарат М-74 быстро всасывается через слизистые и неповрежденную кожу. Торможение активности холинэстеразы и токсические симптомы развиваются уже через

10—15 минут после введения. В биологических средах превращается в сульфоксид и сульфон, которые обладают несколько более высоким антихолинэстеразным действием, чем сульфид, но примерно одинаковой с ним токсичностью (Ю. С. Каган и З. В. Иванова, 1961). Вследствие высокой токсичности препарат не допущен к широкому применению в сельском хозяйстве.

Отравление фосфамидом. Фосфамид (рогор, диметоат, Еф-590, дитрол, фостион ММ, Л-395) представляет собой 0,0-диметил-S-метил — карбамидометилдитиофосфат:



Молекулярный вес 229,25

Фосфамид — белое кристаллическое вещество. Технический препарат — густая маслянистая жидкость желтого цвета с очень неприятным запахом. Температура плавления 49—51°. До 3% растворяется в воде, хорошо растворяется во многих органических растворителях и маслах. Стабилен к гидролизу водой, хорошо гидролизуется щелочью.

Фосфамид токсикологически изучался Т. Н. Паньшиной (1963). Средняя смертельная доза для мышей равна 135 мг/кг, для крыс — 230 мг/кг (технического препарата — соответственно 125 и 172 мг/кг), для кошек — 100 мг/кг, при нанесении на кожу крыс и кроликов — 1000 — 1500 мг/кг.

В опытах на животных Т. Н. Паньшина наблюдала вялость, реже — возбуждение, секрецию из носа, слюнотечение, тремор, судорожные подергивания, нарушения координации движений, атаксию, парез конечностей. Отмечались также увеличение процента содержания гемоглобина и эритроцитов, лейкоцитоз (за счет увеличения количества сегментоядерных нейтрофилов), лимфопения и эозипения, снижение активности каталазы и пироксидазы, снижение уровня рефлекторной деятельности. Снижение активности холинэстеразы крови наступает раньше, чем изменения высшей нервной деятельности. Патоморфологические исследования свидетельствуют о сосудистых и гемодинамических расстройствах, распространенных дистрофических и реже очаговых некробиотических

изменениях в головном мозгу и во внутренних органах (Т. Н. Паньшина и Е. И. Маковская, 1963).

Данные Muratore и др. (1960) свидетельствуют о возможности тяжелых отравлений людей фосфамидом. При этом наблюдаются общая слабость, сонливость, озноб, тошнота, рвота, обильное потоотделение, миоз, координаторные расстройства, коллапс, кома. Пульс малого наполнения, тоны сердца глухие, в легких — застойные хрипы; печень увеличена. Активность холинэстеразы понижена.

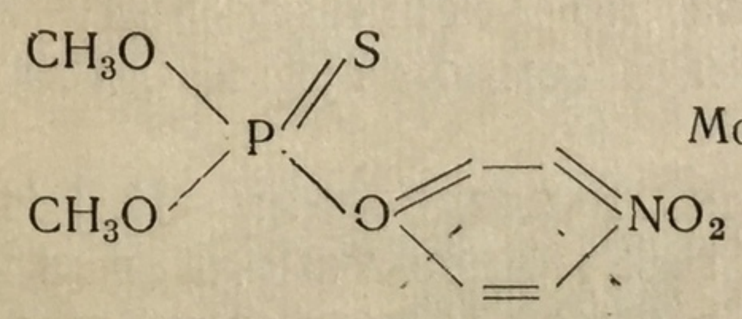
Отравление бутифосом. Бутифос (фолекс, ДЕФ, мерфос) представляет собой, S, S, S-трибутилтритиофосфат:

$(C_4H_9S)_3P{=}0$ Молекулярный вес 284,198

Это жидкость светло-желтого цвета, со стойким очень неприятным запахом. Температура кипения 154° (при 0,5 мм рт. ст.). Нерастворим в воде, но хорошо растворяется в органических растворителях. Выпускается в виде 40—60% концентратов эмульсий. По данным зарубежных авторов, средняя смертельная доза для белых мышей и крыс составляет 177 — 300 мг/кг; по данным Ташкентского медицинского института, для крыс — 580 мг/кг, для мышей — 635 мг/кг, для кроликов — 170 мг/кг. Легко проникает через неповрежденную кожу.

При отравлении животных отмечаются угнетение, вялость и другие симптомы антихолинэстеразного действия. Однако имеются некоторые особенности в клинике интоксикации по сравнению с другими ФОС и отмечается недостаточность профилактического и терапевтического действия больших доз атропина. Это свидетельствует о наличии других этиологических механизмов, кроме антихолинэстеразного (Л. И. Медведь, 1965).

Отравление метилнитрофосом. Метилнитрофос (сумитион, метильный аналог хлортиона, Байер 41831, фолитион) представляет собой 0,0-диметил-3-метил-4-нитрофенилтиофосфат:



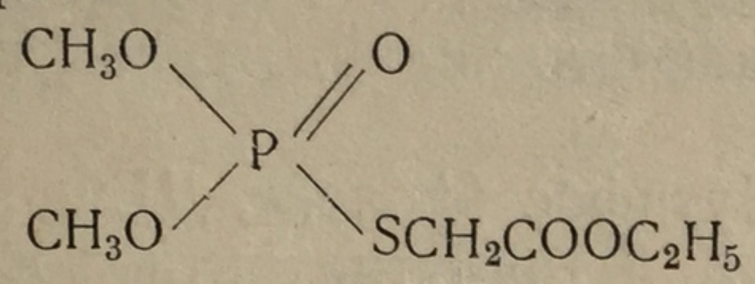
Молекулярный вес 277

Это темно-коричневая жидкость с неприятным запахом. Концентрированная эмульсия содержит 30% дейст-

вующего начала и 70% эмульгатора ОП-7. Температура кипения 145—147° (при 0,5 мм рт. ст.).

Средняя смертельная доза для белых крыс составляет 516 мг/кг. Действует аналогично другим фосфорорганическим соединениям (Л. И. Медведь, 1965).

Отравление метилацетофосом. Метилацетофос представляет собой 0,0-диметил-S-карбо-этоксиметилтиофосфат:

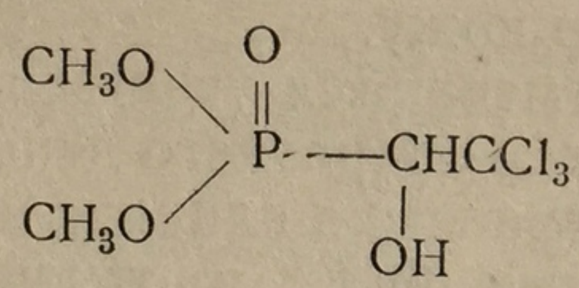


Молекулярный вес 228,21

Это жидкость светло-желтого цвета со специфическим запахом. Температура кипения 116—120° (при 0,35 мм рт. ст.). Хорошо растворим в воде, спиртах и других органических растворителях.

Средняя смертельная доза при введении через рот для белых мышей составляет 300—1020 мг/кг. Действует аналогично тиофосу (Л. И. Медведь, 1965).

Отравление хлорофосом. Хлорофос (диптерекс, Байер-Л-13/59, дилокс, триэлорфон) представляет собой 0,0-диметил-1-окси-2, 2, 2-трихлорэтанфосфонат:



Молекулярный вес 257,42

Химически чистый препарат — белое кристаллическое вещество с запахом эфира. Удельный вес 1,172. Температура плавления 78—83°, температура кипения 78—92°. Растворимость при 25° (1 г на 100) в различных растворителях: вода — 18,0; гексан — 0,08; пентан — 0,1; бензол — 15,2; эфир — 17,0; хлороформ — 75,0. Технический препарат хорошо растворим в воде. Выпускается в виде белого твердого вещества, по внешнему виду напоминающего парафин, или в виде темной густой жидкости с запахом эфира.

Как показали исследования В. И. Вашкова и Е. В. Шнайдера (1962), инсектицидная активность хлорофоса находится в прямой зависимости от степени очищенности препарата: чем лучше очищен препарат, тем он токсичнее для насекомых при контактном действии.

Важным свойством инсектицидного препарата является его летучесть. Хлорофос обладает сравнительно низкой токсичностью для теплокровных животных (табл. 15).

Таблица 15

Токсичность хлорофоса *(по Negherbon, 1959)*

Вид животного	Пути введения препарата	Доза препарата в мг/кг, вызывающая гибель 50% животных
Крысы	Через рот	450
"	Внутрибрюшинно	225
Мыши	Через рот	500
Морские свинки	" "	300
Кролики	Внутрикожно	5000 (летальная доза)

При однократном введении хлорофоса через рот абсолютно летальные дозы для разных видов животных различны: для белых мышей и крыс — 1000 мг/кг, для морских свинок — 700 мг/кг, для кроликов — 500 мг/кг, для кошек — 200 мг/кг.

После введения токсической дозы препарата через 10—15 минут дыхание становится учащенным и прерывистым; развиваются мелкие подергивания отдельных групп мышц, судороги, парезы, нарушается координация движений. При закапывании в глаза кроликов 1—3% раствора хлорофоса раздражения слизистой оболочки не наблюдается, отмечается временное сужение зрачка; при действии 5—10% раствора возникает воспаление слизистой оболочки глаз, которое проходит в течение суток (В. И. Вашков и Е. В. Шнайдер, 1962).

По данным Н. А. Сазоновой, А. П. Волковой и Т. П. Казаковой (1958), хлорофос сильно снижает активность холинэстеразы в крови. У кроликов и кошек после введения препарата через час активность холинэстеразы снижается на 70—90%. При ежедневном введении крысам хлорофоса в дозе 50 мг/кг отмечено понижение активности холинэстеразы крови и тканей (И. Д. Неклесова, 1957). При интоксикации животных В. Г. Цапко (1963) наблюдал одышку, угнетение нервной системы, состояние прострации, нарушения антитоксической функции печени (резкое снижение содержания гиппуровой кислоты в моче при проведении пробы Квика).

Lebrun (1960) проводил опыты по изучению токсичности хлорофоса на людях-добровольцах. Они получали через рот по 7,5 мг/кг хлорофоса в течение 2 дней. Из 15 человек, принимавших участие в опыте, только у одного были отмечены тошнота и колики. Уровень холинэстеразы снизился на 10% для плазмы и на 50% для эритроцитов. Восстановление активности холинэстеразы плазмы в первые дни шло быстро, но затем замедлялось и на 38-й день еще не достигло нормы. Холинэстеразная активность эритроцитов восстанавливалась в течение 120 дней (средняя длительность «жизни» эритроцитов).

До недавнего времени смертельных случаев отравления людей хлорофосом не было отмечено. Однако в самые последние годы в связи с широким применением хлорофоса для уничтожения клопов и других членистоногих стали наблюдаться тяжелые интоксикации хлорофосом людей, нередко со смертельным исходом.

При острых отравлениях людей хлорофосом отмечаются миоз, тошнота, рвота, боли в животе, обильное потоотделение, слезотечение, слюнотечение, одышка, кашель с мокротой, нарушения сердечно-сосудистой деятельности, головные боли, головокружения, повышенная возбудимость, гиперемия; при попадании на кожу — трещины и подкожные кровоизлияния (В. Г. Цапко, 1963).

В судебно-медицинской литературе описаны случаи смертельных отравлений хлорофосом (Г. Д. Чернобродов, 1963; А. Ф. Землянко, А. Ф. Фартушный и В. Н. Балыкин, 1965; Д. Б. Лейкин и А. В. Браун, 1965, и др.). Токсикология и морфология этих отравлений подробно изучены Г. Н. Худяковым (1967).

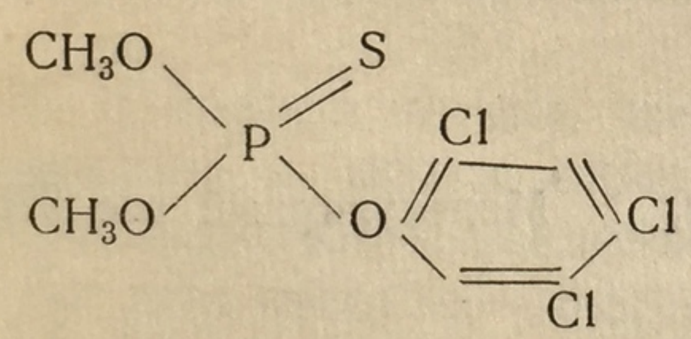
Молодая женщина ошибочно выпила жидкость «от клопов». В больницу доставлена в крайне тяжелом состоянии: без сознания, с явлениями цианоза, акроцианоза и одутловатости лица. Дыхание 36 в минуту, временами судорожные подергивания, непроизвольное мочеиспускание; в легких много влажных хрипов; из трахеотомической трубки вытекает розовая пенистая жидкость; пульс 110 ударов в минуту, ритмичный, слабый. Клинически отмечены явления менинго-энцефалита. Через 3 дня больная скончалась.

При исследовании трупа в полости рта и трахее обнаружены белая густая слизь, небольшой двусторонний гидроторакс, с поверхности разреза легких стекала пенистая розовая жидкость; слизистая оболочка желудка набухшая, со множеством мелких, сливающихся между собой кровоизлияний; печень на разрезе с желтоватыми участками и слабо выраженным мускатным рисунком; в мозговом слое одного из надпочечников — кровоизлияние.

При гистологическом исследовании найдены: расширение и полнокровие сосудов головного мозга, стазы, набухание и полнокровие ткани головного мозга; резкая белковая дистрофия миокарда с фрагментацией мышечных волокон, с неразличимой поперечной исчерченностью, с набухшими, слабо окрашенными и увеличенными в объеме ядрами; отек отдельных участков легких со свежими эритроцитами и клетками альвеолярного эпителия, участки мелкоочаговой пневмонии с геморрагическим оттенком; далеко зашедшая дистрофия печеночных балок (контуры клеток слабо различимы, ядра бледные, протоплазма имеет пенистый вид, отмечается жировая дегенерация); резкая зернистая дистрофия эпителия извитых канальцев почек, доходящая до состояния некробиоза, эпителий прямых канальцев слущен; множественные вакуоли в пульпе селезенки с гемолизом и умеренным миелозом; слизистая оболочка желудка истончена, очаговый некробиоз (ожог), отек подслизистого слоя, кровоизлияния в нем, мышечный слой разрыхлен (Г. Д. Чернобродов, 1963).

Методы изолирования, обнаружения и количественного определения хлорофоса применительно к судебно-химическим задачам разработаны А. Ф. Фартушным (1964) с использованием пиридиновой пробы, реакции на хлор и холинэстеразной пробы. Наличие в молекуле хлорофоса хлорсодержащей части, метоксигруппы и фосфора дало возможность автору разработать новые по отношению к хлорофосу реакции: резорциновой и изонитрильной проб, реакций на метоксигруппу и фосфор.

Отравление трихлорметафосом-3. Этот препарат представляет собой 0-метил-0-этил-0, 2, 4, 5-трихлорфенилтиофосфат:



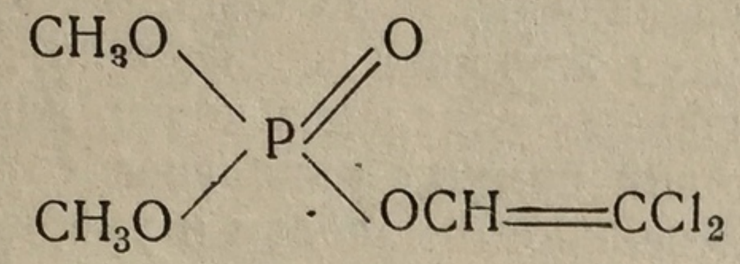
Молекулярный вес 335,58

Химически чистый препарат — жидкость желтого цвета со слабым неприятным запахом. Температура кипения 127—133° (при 0,15 мм рт. ст.). Нерастворим в воде, но хорошо растворяется в большинстве органических растворителей. Выпускается в виде 30—50% эмульсии.

Средняя смертельная доза для белых крыс составляет 330 мг/кг. Через 30—60 минут после введения яда у животных появляются вялость, сонливость, шаткая походка, взъерошенность шерсти, нарушение ритма дыхания, фибриллярные подергивания мышц задних конечностей и спины, затем парез задних конечностей. Реакция зрачков на свет отсутствует, слезотечение, падение температуры

тела (на 5—8°). При введении крысам 200 мг/кг в первые 24 часа холинэстераза крови полностью угнетена (Л. И. Медведь, 1965).

Отравление ДДВФ. ДДВФ (винилфосфат, дихлорвос, перкола, вапона, геркол 5 ОВЕ В. Ф.) представляет собой 0,0-диметил-0,2,2-дихлорвинилфосфат.

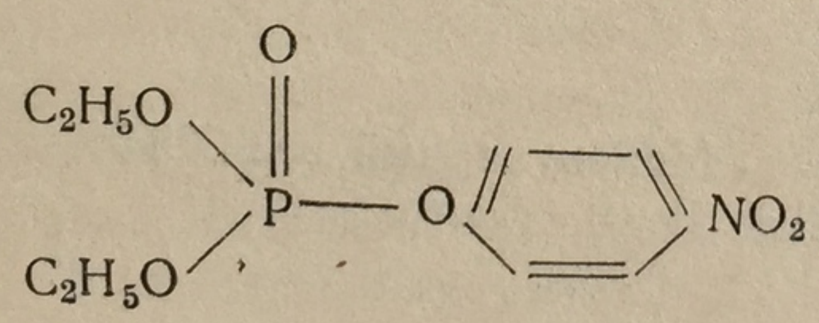


Молекулярный вес 220,989

ДДВФ — продукт дегидрохлорирования хлорофоса. Это бесцветная прозрачная жидкость с неприятным запахом. Температура кипения 120° (при 14 мм рт. ст.). В воде нерастворим. Обладает летучестью. Быстро разрушается во внешней среде.

Средняя смертельная доза при введении через рот для белых крыс составляет 25 — 60 мг/кг, для белых мышей —30—124 мг/кг. Токсикологически действует подобно тиофосу, однако концентрация паров 0,7 мг/л не дает снижения активности холинэстеразы у людей и обезьян. При отравлении отмечается металлический вкус во рту (Л. И. Медведь, 1965).

Отравление фосфаколом. Фосфакол (Е-600, минтакол, параоксон) — 0,0-диэтил-0-паранитрофенилфосфат:



Молекулярный вес 275,0

Это желто-коричневая жидкость. Удельный вес 1,2. Температура кипения (при 2 мм рт. ст.) составляет 178°. Легко растворяется в органических растворителях; растворимость в воде при комнатной температуре около 0,1%. Синтезирован во ВНИХФИ В. В. Катышкиной. Выпускается в склянках, содержащих 10 мл раствора 1 : 50 000, 1 : 75 000 и 1 : 100 000.

Описание фармакологической характеристики фосфакола имеется у И. М. Шарапова (1951а,б; 1952), Holmstedt (1951, 1959), Aldridge, Davison (1952), и др.

И. М. Шарапов установил, что в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ в опытах на спинной мышце пиявки и прямой мышце жи-

вота лягушки фосфакол сильно повышает чувствительность обоих объектов к ацетилхолину. Было также изучено манометрическим методом угнетающее влияние фосфакола на холинэстеразу головного мозга белой крысы и сыворотки крови собаки (табл. 16). Общее действие и токсичность изучались на белых мышах, кроликах, кошках и собаках. $ДЛ_{50}$ при подкожном введении у белых мышей составляла 0,9 мг/кг, при внутривенном — 0,65 мг/кг.

Таблица 16

Угнетающее влияние фосфакола на холинэстеразу головного мозга белой крысы и сыворотки крови собаки *(по И. М. Шарапову, 1951)*

Молярная концентрация фосфакола	Уменьшение активности холинэстеразы (в %)	
	мозга	сыворотки
M^{-6}	—	100
M^{-7}	100	75
$2 \cdot M^{-8}$	80	—
$5 \cdot M^{-8}$	—	54
M^{-8}	67	22
M^{-9}	28	18
$5 \cdot M^{-10}$	0	—

И. М. Шарапов нашел, что фосфакол менее токсичен, чем прозерин, и почти одинаково токсичен с эзерином ($ДЛ_{50}$ при подкожном введении для прозерина составляет 0,53 мг/кг, для эзерина —0,86 мг/кг). Фосфакол обладает сильным миотическим действием (уже в концентрации 1 : 150 000), сильно повышает тонус мускулатуры кишечника, усиливает реакцию сердечно-сосудистой системы и кишечника на ацетилхолин. Эти влияния снимаются атропином.

Фосфакол уже в субтоксических дозах вызывает заметное нарушение корковой деятельности. Так, Н. В. Саватеев (1957), изучая действие фосфакола на условнорефлекторную деятельность мышей, нашел, что уже в дозе 0,1 мг/кг фосфакол ускоряет образование двигательных и оборонительных условных рефлексов и усиливает дифференцировочное торможение.

Фосфакол нашел применение в медицинской практике как средство, вызывающее сужение зрачка, понижение внутриглазного давления и спазм аккомодации. Он обладает способностью усиливать моторную функцию кишечника, секрецию желез, сокращения мускулатуры матки и мочевого пузыря, повышать тонус бронхиальной мускулатуры, обладает тонизирующим и возбуждающим действием на центральную нервную систему и т. д. М. Б. Эйдинова и Э. А. Эдельштейн (1951) с успехом применили фосфакол при центральных и периферических двигательных нарушениях. Они нашли, что по своему действию фосфакол эффективнее прозерина: он менее токсичен, обладает более стойким терапевтическим эффектом и вызывает определенную тренировку движений.

С помощью электронной микроскопии В. С. Петров (1961) установил, что в эритроцитах периферической крови в процессе отравления фосфаколом наступает повреждение стромы, которое проявляется в виде состояния пороза эритроцитов. Пороз сопровождается уменьшением содержания в эритроцитах гемоглобина и снижением их устойчивости к различным внешним и внутренним повреждающим факторам. Эти изменения, по мнению автора, носят неспецифический характер.

Фосфакол обладает сильным инсектицидным действием, однако в качестве инсектицида не получил распространения вследствие своей очень высокой токсичности для человека и животных. Он легко проникает через кожу человека и может быть причиной тяжелых отравлений (С. Н. Голиков и В. И. Розенгарт, 1960, 1964). Поэтому изучение токсического действия фосфакола на организм и посмертная его диагностика представляют известный интерес для судебной медицины.

В ориентировочных опытах на 32 белых мышах мы установили максимально переносимую дозу фосфакола при подкожном введении. Эта доза оказалась равной 1 мг/кг. В наших опытах максимально переносимая доза фосфакола оказалась несколько выше, чем $ДЛ_{50}$, по данным И. М. Шарапова (0,9 мг/кг). Возможно, это объясняется различиями в активности имевшегося в нашем распоряжении препарата или различиями в чувствительности подопытных животных. Токсикологические явления у мышей выражались в увеличении двигательной активности, дрожании, атаксии, мышечных подергиваниях, клонико-

тонических судорогах, частой дефекации. Дыхание вначале возбуждалось, а затем появлялись нарушения его ритма и глубины и, наконец, оно останавливалось.

В 1955—1956 г. Флорин Исак провел ряд исследований, посвященных изменению активности холинэстеразы головного мозга и мышц белых мышей при отравлении фосфаколом. Им были проведены четыре серии опытов. В первой серии определялась активность холинэстеразы мышей после их декапитации. Эта серия послужила контролем. Во второй серии мышам вводили подкожно одну максимально переносимую дозу фосфакола, т. е. 1 мг/кг веса. В третьей серии подопытным животным фосфакол был введен в дозе 0,1 мг/кг, т. е. в 10 раз меньше максимально переносимой дозы. В четвертой серии фосфакол вводили в дозе 10 мг/кг. В последней серии опытов мыши погибали через 10—12 минут после введения препарата.

Результаты, полученные Ф. Исаком (1958) при определении активности холинэстеразы биологическим методом, приведены в табл. 17 и на рис. 21.

Из табл. 17 видно, что при отравлении белых мышей фосфаколом в дозе 0,1 мг/кг активность холинэстеразы головного мозга и мышечной ткани снижалась соответственно на 38,1 и 55,7%. При отравлении мышей макси-

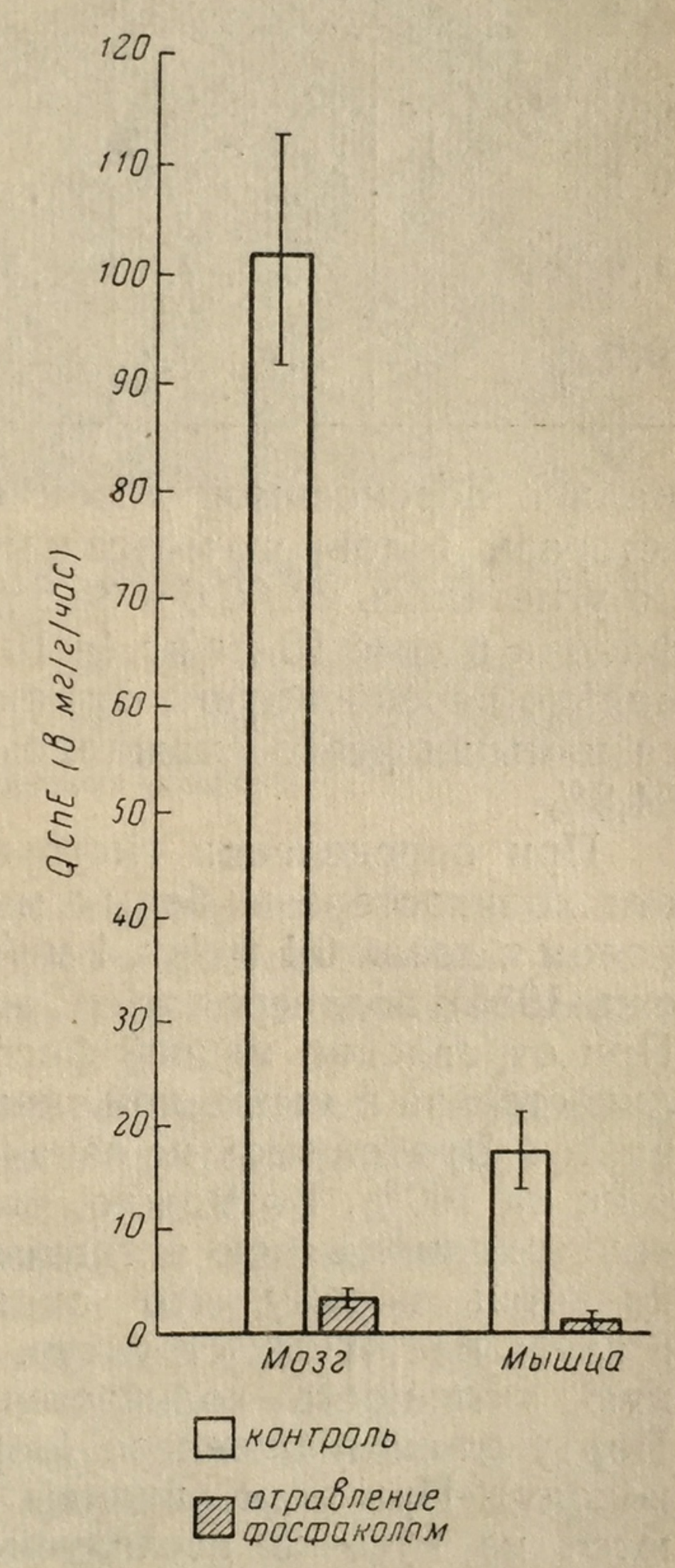


Рис. 21. Коэффициент активности холинэстеразы мозга и мышц белых мышей при отравлении фосфаколом (10 мг/кг) (объяснение см. в тексте).

Таблица 17

Коэффициент активности холинэстеразы (QChE) мозга и мышц белых мышей при отравлении фосфаколом

(в мг/г/час) (по Ф. Исак, 1958)

Доза (в мг/кг)	QChE мозга	В %	Процент угнетения	Мышцы	В %	Процент угнетения
Контроль (декапитация)	102,1 ± 4,7 91,5 ÷ 112,7	100	0	17,4 ± 1,6 13,8 ÷ 21,0	100	0
0,1	63,2 ± 7,3 42,9 ÷ 83,5	61,9	38,1	9,7 ± 0,1 8,6 ÷ 10,8	55,7	44,3
1,0	32,2 ± 2,5 25,3 ÷ 39,3	31,5	68,5	6,2 ± 0,3 5,4 ÷ 7,0	35,6	64,4
10,0	3,4 ± 0,2 2,8 ÷ 4,0	3,3	96,7	0,9 ± 0,1 0,6 ÷ 1,2	5,2	94,8

мально переносимой дозой (1 мг/кг) активность холинэстеразы головного мозга и мышечной ткани соответственно угнеталась на 68,6 и 35,6%. При введении мышам фосфакола в дозе 10 мг/кг (в 10 раз превышающую максимально переносимую дозу) активность холинэстеразы мозга и мышц резко снижалась: соответственно на 96,7 и 94,8%.

При определении гистохимическим методом активности холинэстеразы белых мышей, затравленных фосфаколом в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг и 10 мг/кг, мы (Я. С. Смусин, 1955) подтвердили ту же закономерность (рис. 22). При отравлении мышей фосфаколом в дозе 10 мг/кг холинэстераза в мышечной ткани совершенно не обнаруживается. Это, однако, не означает, что холинэстераза угнетена на 100%. Возможно, что некоторая часть фермента еще сохранила свою активность, но эта активность не выявляется потому, что ацетилтиохолин не проникает в глубь клеточных структур. Чтобы выявить эту остаточную активность холинэстеразы, мы применили способ Португалова и Яковлева (обработка тканей ацетоном на холоду). При этом липоиды в значительной мере удаляются из кусочка исследуемой ткани, и ацетилтиохолин проникает и в те участки ткани, где холинэстераза частично сохранилась. Рис. 22, *в* показывает, что после обработки ацетоном удается обнаружить следы активной холинэстеразы и в тканях животного, убитого большими дозами фосфакола.

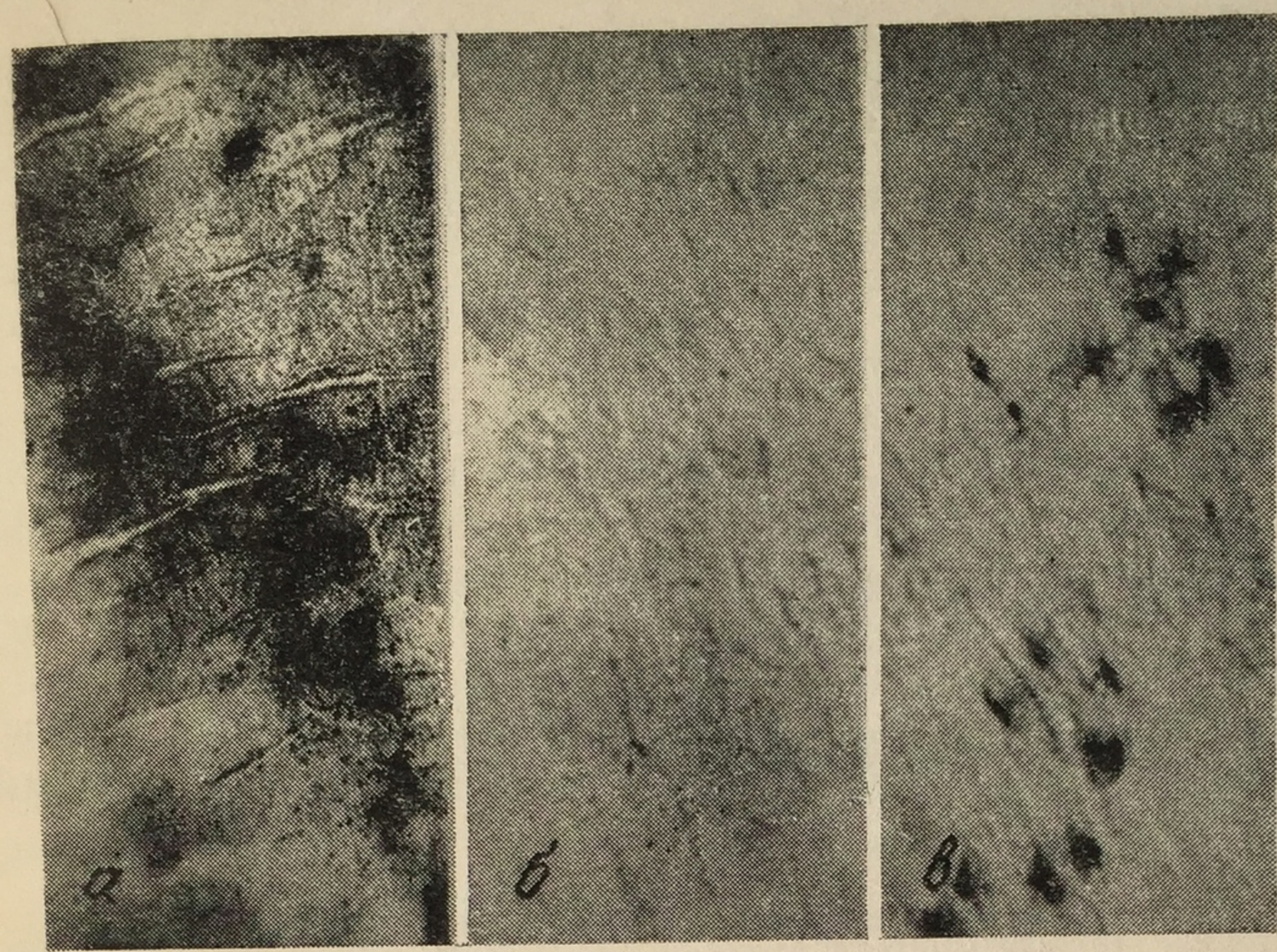


Рис. 22. Отравление фосфаколом. Икроножная мышца белой мыши.

а — контроль; *б*, *в* — отравление: *б* — истинная холинэстераза не определяется (ткань не обработана ацетоном), *в* — определяется истинная холинэстераза, но менее окрашенная, чем в контроле (ткань предварительно обработана ацетоном). Ок. 5, об. 8. Фотографирование произведено при одинаковых условиях.

Таким образом, фосфакол относится к веществам, сильно угнетающим активность холинэстеразы как в центральной нервной системе, так и в периферических тканях.

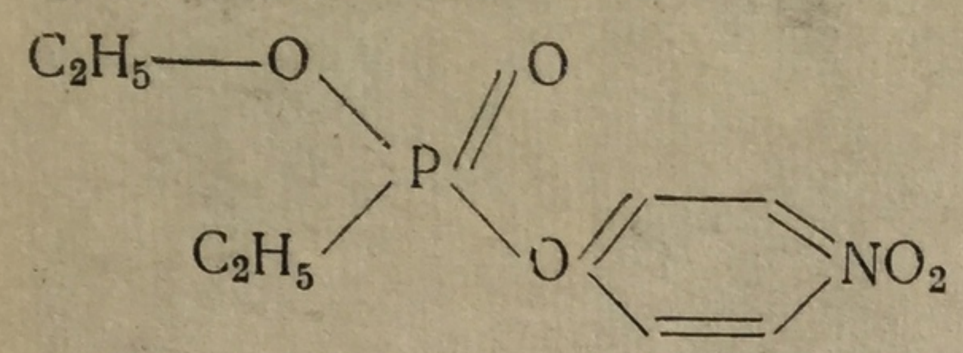
Холинэстераза может быть обнаружена гистохимическим методом даже в тех случаях, когда другими методами это сделать затруднительно.

Сильное угнетение активности холинэстеразы центральной нервной системы может быть объяснено тем, что фосфакол находится в организме в виде назаряженного основания, проникающего из крови в мозг.

Отравление армином. Армин синтезирован А. И. Разумовым в лаборатории Органической химии имени А. Е. Арбузова Казанского химико-технологического института имени С. М. Кирова.

В чистом виде армин представляет собой жидкость желто-оранжевого цвета, растворимую в воде 1 : 300, а также во многих органических растворителях.

Армин является этил-паранитрофениловым эстером этилфосфиновой кислоты:



Молекулярный вес 259,0

В основе биологической активности армина лежит его антихолинэстеразное действие. По антихолинэстеразному действию он оказался сильнее прозерина, фосфакола и эзерина. В разведении $1 \cdot 10^{-8}$ и $5 \cdot 10^{-9}$ армин подавляет активность холинэстеразы на 100% (М. А. Алуф, 1955).

А. И. Разумов (1957) приводит следующие данные по антихолинэстеразному действию и токсичности армина (табл. 18).

Антихолинэстеразное действие и токсичность армина *(по А. И. Разумову, 1957)*

Токсичность для мышей (в мг/кг)		Концентрация, угнетающая холинэстеразу на 50%			
		биологический метод		биохимический метод	
подкожно	внутривенно	истинная	ложная	истинная	ложная
0,54	0,40	$1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-8}$

И. В. Семенов и Н. К. Фруентов (1957) нашли, что концентрация армина, угнетающая активность истинной холинэстеразы на 50%, составляет $2 \cdot 10^{-9}$.

Чжан Фань (1960) установил концентрации армина, тормозящие на 50% холинэстеразу сыворотки и эритроцитов крови человека (соответственно $5{,}3 \cdot 10^{-8}$ и $2{,}2 \cdot 10^{-8}$). В опытах in vivo автор нашел, что при дозе 0,1 мг/кг армин угнетает активность холинэстеразы на 70%.

Фармакологические свойства армина были подробно изучены М. А. Алуф (1955). У кроликов наблюдалось уменьшение вентиляции легких на 10—30% (при введении армина в дозах 0,03—0,06 мг/кг). У кошек введение армина в дозах 0,2 мг/кг и выше приводило к угнетению дыхания, понижению или увеличению кровяного давления.

В настоящее время лечебное действие армина широко изучается. Армин начали применять при миастении, детском параличе и при некоторых других заболеваниях. Армин вошел в медицинскую практику как средство против глаукомы. Армин обладает способностью вызывать сильный и стойкий миоз и снижать внутриглазное давление. При глаукоме он является более мощным лечебным средством, чем пилокарпин, фосфакол (минтакол), фурамон и др. С. И. Локтионов (1960) показал, что армин не обладает прямым холиномиметическим действием на мышцу радужки, а миотический эффект обусловлен антихолинэстеразным действием.

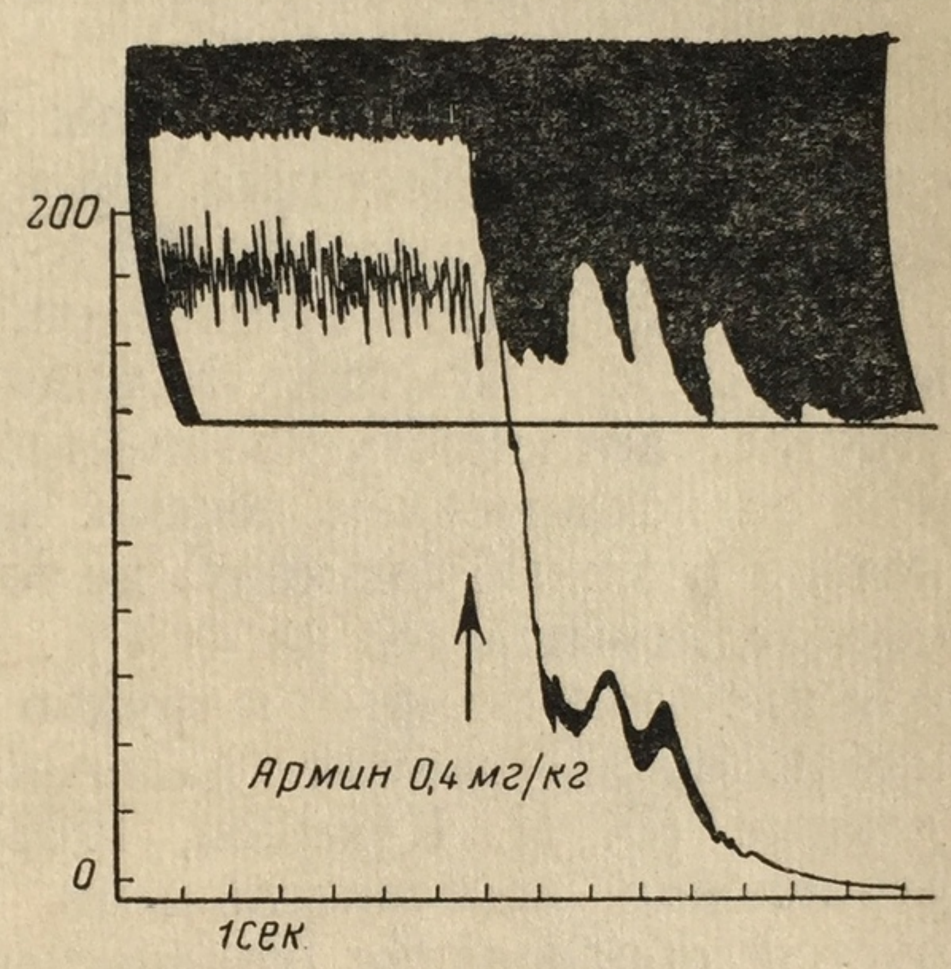


Рис. 23. Бронхоспазм у кошки при внутривенном введении армина. Записи сверху вниз: показания пистон-рекордера; кровяное давление в общей сонной артерии; линия, соответствующая полному бронхоспазму; отметка времени (1 минута). Вертикальной стрелкой обозначен момент внутривенного введения армина (0,4 мг/кг) (по И. В. Семенову, 1958).

Как было обнаружено И. В. Семеновым (1958), армин в дозе 0,4 мг/кг при внутривенном введении вызывает полный бронхоспазм у кошки (рис. 23). Арминовый бронхоспазм не снимается, а только немного уменьшается перерезкой блуждающих нервов; после их предварительной перерезки минимальная доза, вызывающая полный спазм, не увеличивается, но только спазм развивается медленнее. Отсюда автор делает предположение, что наряду с антихолинэстеразным действием в механизме арминового бронхоспазма имеет значение и прямое холиномиметическое действие.

В проведенных нами опытах на кошках (Я. С. Смусин, 1963) армин вводили внутримышечно в дозах 0,75 мг/кг. Через 10—15 минут после введения наступали явления отравления в виде двигательной активности, агрессив-

ности, атаксии, дрожания, одышки, миоза, дефекации, мочеиспускания. Затем появлялись клонико-тонические судороги, фибриллярные сокращения, слюнотечение, слезотечение. Обычно при резко выраженных явлениях отравления животные погибали.

Мы исследовали активность холинэстеразы крови, миокарда левого желудочка, ягодичных мышц, легких (краевые отделы), печени, коры больших полушарий головного мозга, хвостатого ядра, среднего мозга, мозжечка, продолговатого мозга, спинного мозга (шейный отдел).

Активность холинэстеразы определялась биохимическим методом Хестрина. Определения производили на фотоэлектроколориметре ФЭК-М.

Результаты проведенных опытов приведены в табл. 19 и на рис. 24. Из табл. 19 видно, что армин значительно угнетает активность холинэстеразы всех органов и тканей, за исключением печени. Активность холинэстеразы печени (ложный фермент) не только не угнетается, а, наоборот, повышается на 41,4%. Этот результат является для нас неожиданным и трудно объяснимым. Полученные наблюдения требуют дальнейшего анализа. Имеются данные (Б. И. Кадыков, 1957), что при хроническом отравлении незначительными дозами ФОС стимулируется образование холинэстеразы печенью, что приводит к увеличению содержания энзима в крови и тканях.

Угнетение активности холинэстеразы периферических тканей (миокард, мышечная ткань, легкие) составляет от 44,2 до 66,5% от исходной. Однако наиболее угнетение активности холинэстеразы происходит в крови и в центральной нервной системе: холинэстераза коры, хвостатого ядра, среднего мозга, мозжечка, продолговатого мозга, спинного мозга и крови угнетена на 64,6—79%.

Сильное угнетение активности холинэстеразы центральной нервной системы может быть объяснено тем, что армин находится в организме в виде незаряженного основания, проникающего из крови в мозг.

Отравление изомеркаптофосом и его метилсульфометилатом. Еще в 1939 г. Schweitzer, Stedman и Wright показали, что эзерин, содержащий третичный азот, в отличие от прозерина, содержащего четвертичный азот,

Таблица 19

Коэффициент активности холинэстеразы (в мг/г/мин) органов и тканей кошек при отравлении армином

Таблица 19

Коэффициент активности холинэстеразы (в мг/г/час) органов и тканей кошек при отравлении армином
(0,75 мг/кг внутримышечно)

Коэффициент активности холинэстеразы	Миокард	Мышцы	Легкие	Печень	Кора	Хвостатое ядро
Контроль	7,5±1,0 5,3÷9,7	8,6± 1,3 5,7÷11,5	18,8± 1,4 15,6÷22,0	20,3± 2,5 14,6÷26,0	16,4± 1,3 13,5÷19,3	386,9± 25,1 331,7÷442,1
Отравление армином	3,8±0,7 2,3÷5,3	4,8± 1,2 1,8÷ 7,8	6,3± 0,9 4,4÷ 8,2	28,7± 2,6 23,2÷34,2	5,8± 0,9 3,9÷ 7,7	90,7± 20,2 47,9÷133,5
Процент сохранившейся холинэстеразы	50,7	55,8	33,5	141,4	35,1	23,4
Процент угнетения холинэстеразы	9,3	44,2	66,5	—	64,9	76,6

Продолжение

Коэффициент активности холинэстеразы	Средний мозг	Мозжечок	Продолговатый мозг	Спинной мозг	Кровь	Сыворотка	Эритроциты
Контроль	76,3± 5,2 64,9÷87,7	143,7± 26,4 85,6÷201,8	56,8± 3,5 49,1÷64,5	25,6± 2,0 21,1÷30,1	4,9±0,9 2,6÷7,2	2,9±0,3 2,1÷3,7	4,9±1,2 1,8÷8,0
Отравление армином	21,7± 7,1 6,6÷36,8	30,2± 5,1 19,4÷41,0	13,2± 1,9 9,2÷17,2	6,9± 0,9 5,0÷ 8,8	1,2±0,4 0,2÷2,2	1,9	1,8
Процент сохранившейся холинэстеразы	28,4	21,0	23,2	27,0	24,5	65,5	36,7
Процент угнетения холинэстеразы	71,6	79,0	76,8	73,0	75,5	34,5	63,3

хорошо проникает в центральную нервную систему, где вызывает угнетение активности холинэстеразы и тем са-

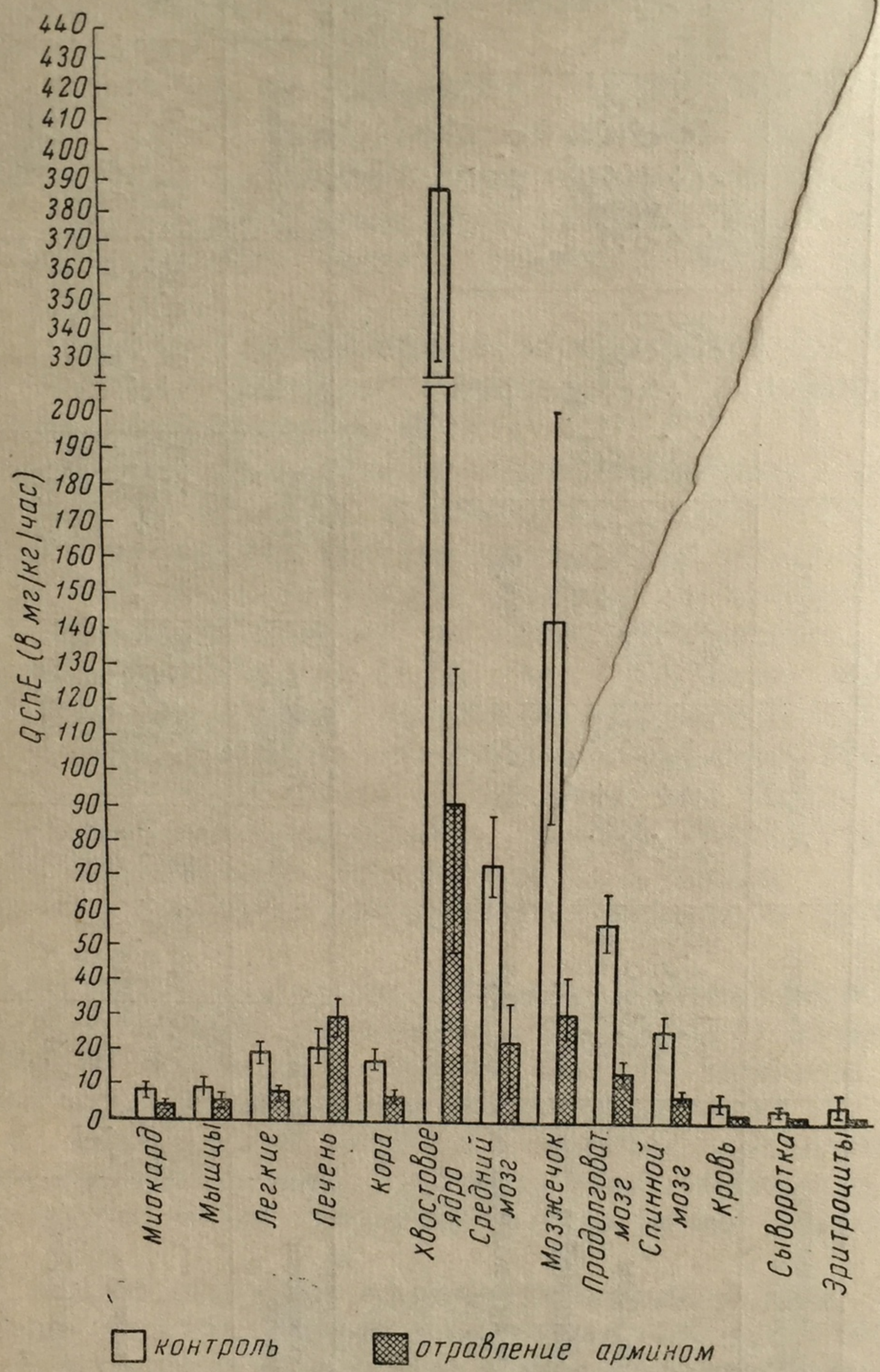


Рис. 24. Коэффициент активности холинэстеразы органов и тканей кошек при отравлении армином (0,75 мг/кг) (объяснение см. в тексте).

мым стабилизацию ацетилхолина. Эти различия авторы объясняют тем, что вещества с третичным атомом азота

хорошо проникает в центральную нервную систему, где вызывает угнетение активности холинэстеразы и тем са-

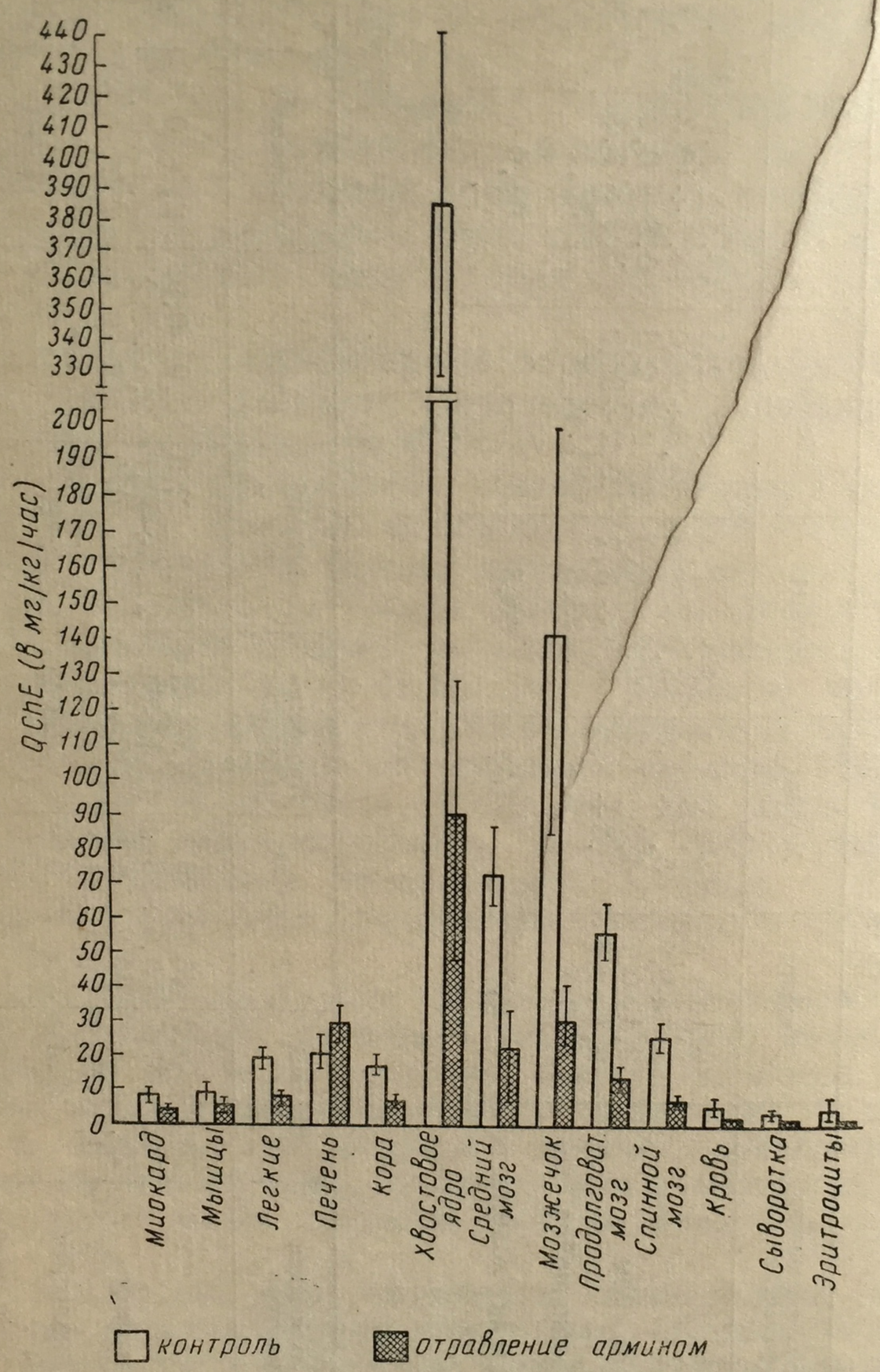


Рис. 24. Коэффициент активности холинэстеразы органов и тканей кошек при отравлении армином (0,75 мг/кг) (объяснение см. в тексте).

мым стабилизацию ацетилхолина. Эти различия авторы объясняют тем, что вещества с третичным атомом азота

хорошо растворимы в липоидах, а потому способны проникнуть через клеточные мембраны. Наоборот, вещества с четвертичным атомом азота нацело ионизированы и потому нерастворимы в липоидах. Это лишает их способности проникнуть через липоидные мембраны клеток центральной нервной системы. К аналогичным выводам пришли Koelle и Steiner (1956). Это явление имеет значение и для распределения в организме серусодержащих фосфорорганических соединений.

Не только теоретическое и фармакологическое, но и большое судебно-медицинское значение для посмертной диагностики представляет вопрос об общих закономерностях в изменении центрального и периферического действия при переводе третичных аминов в четвертичные аммониевые соединения, а также при превращении веществ с двухвалентной серой в соответствующие сульфониевые соединения.

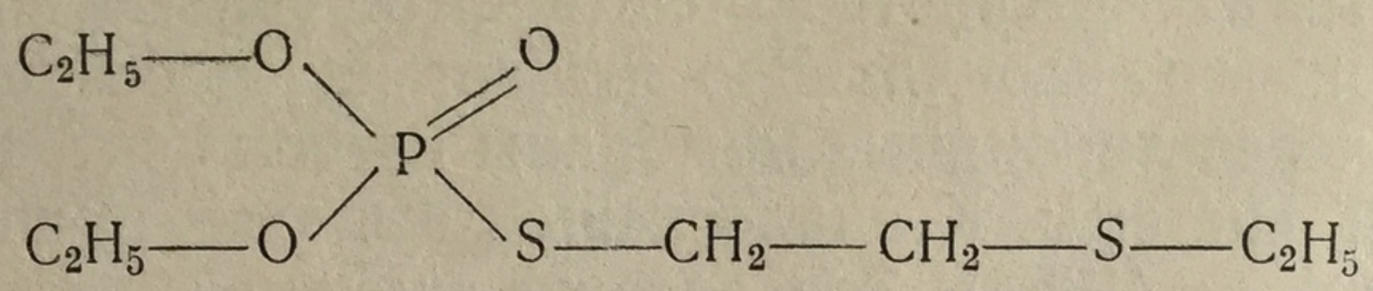
В 1957 г. Э. В. Зеймаль, М. Я. Михельсон и Р. С. Рыболовлев обобщили большой фактический материал, полученный в лаборатории, руководимой М. Я. Михельсоном, и охватывающий несколько групп веществ, различающихся как по химическому строению, так и по характеру действия на холинергические системы. Авторы пришли к выводу, что все холинолитические вещества с третичным азотом (хлоргидраты пентафена, дифазина, альфа-метилдифазина и арпенала) обладают выраженным центральным действием, в то время как йодметилаты и метилсульфометилаты во всех группах холинолитических веществ практически лишены центрального действия. Эти факты подтверждены и в клинике.

При изучении холиномиметических веществ, содержащих азот, обнаружилась та же закономерность — при переводе третичного азота в четвертичный путем йодметилирования центральное действие их практически исчезает (Э. В. Зеймель, Р. С. Рыболовлев, 1957; Н. Я. Лукомская, 1957; А. С. Рыболовлев, 1953).

В отношении антихолинэстеразных веществ также имеются данные, что йодметилирование веществ группы эзерина и его синтетических заменителей приводит к ослаблению и качественному изменению центрального действия (Schweitzer, Stedman и Wright, 1939).

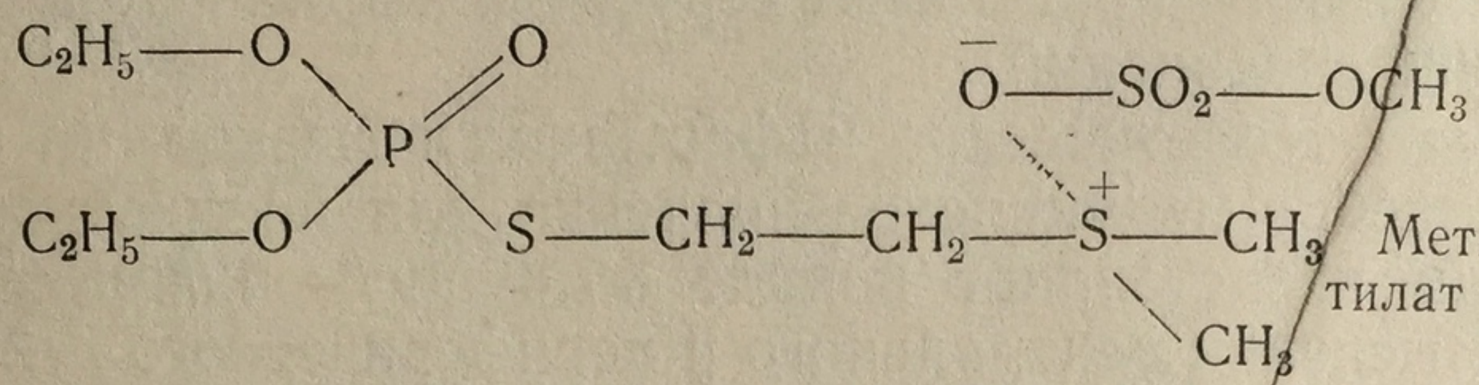
Для проверки этих данных мы сравнили антихолинэстеразное действие изосистокса и его метилсульфомети-

лата, синтезированных Т. А. Мастрюковой в лаборатории, руководимой М. И. Кабачником.



Изосистокс

Молекулярный вес 258,0



Метилсульфометилат изосистокса

Молекулярный вес 370,0

Изосистокс (0,0-диэтил-S-бета-этилмеркаптоэтилфосфат) содержит двухвалентную серу, а его метилсульфометилат — это сульфониевое соединение, содержащее трехковалентную серу, несущую на себе положительный заряд.

Изосистокс (изомеркаптофос) — слабо летучая бесцветная жидкость с неприятным запахом. В воде растворим плохо. Растворы высоких концентраций могут быть приготовлены на органических растворителях. Мелкодисперсная водная эмульсия может быть получена с эмульгатором ОП-7.

Изосистокс обладает сильным контактным инсектицидным действием, но очень опасен для человека и других теплокровных животных. Он способен проникать в организм через дыхательный и пищеварительный тракт, а также всасываться через неповрежденную кожу. Так, $ДЛ_{50}$ для крысы при пероральном введении равняется 2,5—6,2 мг/кг, а при накожной аппликации — 8,2—14 мг/кг (Metcalf, 1957).

По данным Metcalf (1957), ДЛМ (минимальная летальная доза) тиолового изомера систокса для человека составляет приблизительно 20 мг/кг. Г. Л. Таранович (1956), изучавший токсичность изосистокса для мышей при подкожном введении, приводит следующие цифры: ДМП (максимально переносимая доза) равняется 5 мг/кг, $ДЛ_{50}=6{,}98$ мг/кг, $ДЛ_{100}=9$ мг/кг.

Изосистокс сильно угнетает холинэстеразу. Концентрация, угнетающая истинную холинэстеразу на 50%, со-

ставляла в опытах разных авторов от $3 \cdot 10^{-7}$ М до $1{,}2 \cdot 10^{-6}$ М.

При длительном хранении препарат спонтанно метилируется по атому серы, находящемуся в бета-положении, который в результате приобретает положительный заряд.

Метилсульфометилат изосистокса — сиропообразная масса, легко растворимая в воде. Очень сильное антихолинэстеразное вещество. По данным разных авторов, J_{50} истинной холинэстеразы колеблется от $2 \cdot 10^{-9}$М до $3{,}9 \cdot 10^{-8}$М.

Сочетание сильного антихолинэстеразного действия с высокой растворимостью в воде позволило зарубежным авторам предложить этот препарат в качестве системного (внутрирастительного) сельскохозяйственного инсектицида.

Фармакологические свойства препарата впервые изучались в лаборатории, руководимой М. Я. Михельсоном.

Мы определяли степень торможения холинэстеразы в мозгу и в мышцах при действии изосистокса и его метилсульфометилата (Я. С. Смусин, 1957). Соотношение степени торможения холинэстеразы в центральной нервной системе и в периферических тканях дает возможность судить о распределении изучавшихся антихолинэстеразных препаратов в организме.

Было установлено, что доза, вызывающая смерть в течение первых суток у 50% мышей при подкожном введении ($ДЛ_{50}$), оказалась для изомеркаптофоса равной 6,7 мг/кг, что почти соответствует данным Г. Л. Тарановича (1956), а для его метилсульфометилата — 0,057 мг/кг, т. е. метилсульфометилат оказался в 118 раз токсичнее изомеркаптофоса.

Степень торможения холинэстеразы сравнивалась при действии равных по эффекту доз обоих веществ. При определении активности холинэстеразы по Платтнеру вводили дозы, соответствующие $ДЛ_{50}$. Результаты определения степени торможения активности холинэстеразы при действии изомеркаптофоса и его метилсульфометилата методом Платтнера приводятся в табл. 20 и на рис. 25.

При действии изомеркаптофоса холинэстераза в мозгу и в мышцах угнеталась соответственно на 81 и 92,7% от исходного. Если у контрольных здоровых животных активность холинэстеразы мозга выше активности холин-

Таблица 20

Торможение активности холинэстеразы мозга и мышц белых мышей при отравлении изомеркаптофосом и его метилсульфометилатом (в мг/г/час)

	Количество мышей	QChE мозга	В %	Процент угнетения	QChE мышцы	В %	Процент угнетения	QChE мозга / QChE мышцы
Контроль (декапитация)	37	88,5± 4,2 80,3÷96,7	100	0	14,1± 1,1 11,8÷16,4	100	0	6,3
Изомеркаптофос	8	16,8± 2,2 11,6÷21,0	19	81	1,03±0,21 0,53÷1.53	7,3	92,7	16,3
Метилсульфометилат изомеркаптофоса	8	57,7± 6,2 43,1÷72,3	65,2	34,8	1,92±0,3 1,22÷2,62	13,6	86,4	30,1
QChE контроля / QChE изомеркаптофоса		5,3			13,7			22
QChE контроля / QChE метилсульфометилата изомеркаптофоса			1,5				7,3	

эстеразы мышц в 6,3 раза, то при отравлении изомеркаптофосом холинэстераза мозга оказалась активнее холинэстеразы мышц в 16,3 раза.

При действии метилсульфометилата изомеркаптофоса холинэстераза мышц угнеталась в 2,4 раза сильнее, чем холинэстеразная активность мозга. Если у контрольных животных холинэстеразная активность мозга в 6,3 раза выше, чем активность холинэстеразы мышц, то у животных, отравленных метилсульфометилатом изомеркаптофоса, холинэстеразная активность мозга в 30,1 раза выше активности мышц. Как видно из табл. 20, при действии метилсульфометилата изомеркаптофоса сильное угнетение активности холинэстеразы отмечено только в мышцах (снижение до 13,6% по сравнению с контролем), а в мозгу сохранилось 65,2% активности энзима.

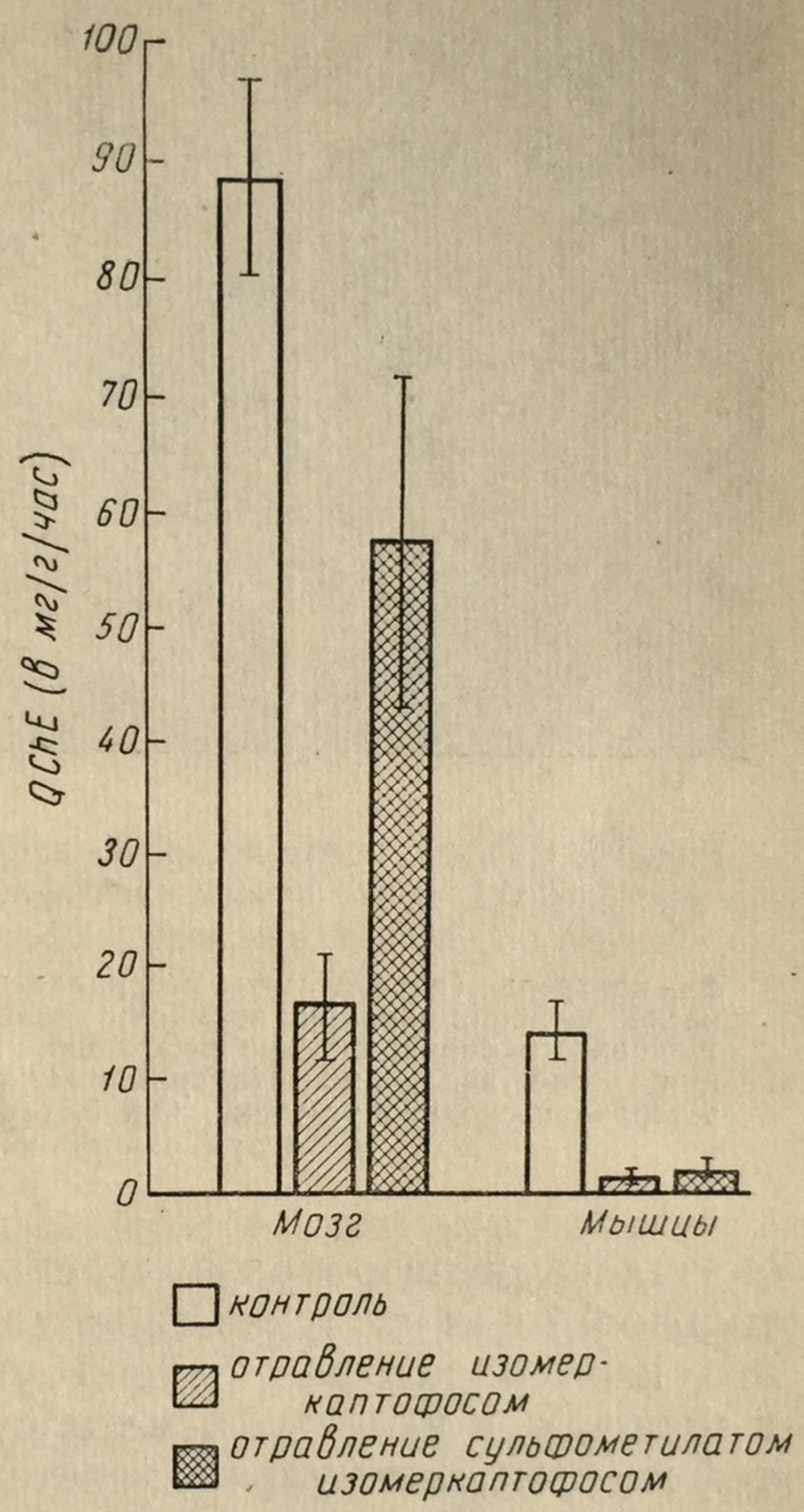


Рис. 25. Коэффициент активности холинэстеразы мозга и мышц белых мышей при отравлении изомеркаптофосом и его метилсульфометилатом (объяснение см. в тексте).

Таким образом, при отравлении мышей изомеркаптофосом отмечалось угнетение активности холинэстеразы головного мозга и мышечной ткани соответственно на 81 и 92,7%. При отравлении метилсульфометилатом изомеркаптофоса эти соотношения соответственно составили 34,8 и 86,4%.

То же подтвердилось и при исследовании гистохимическим методом. Однако здесь для удобства сравнения

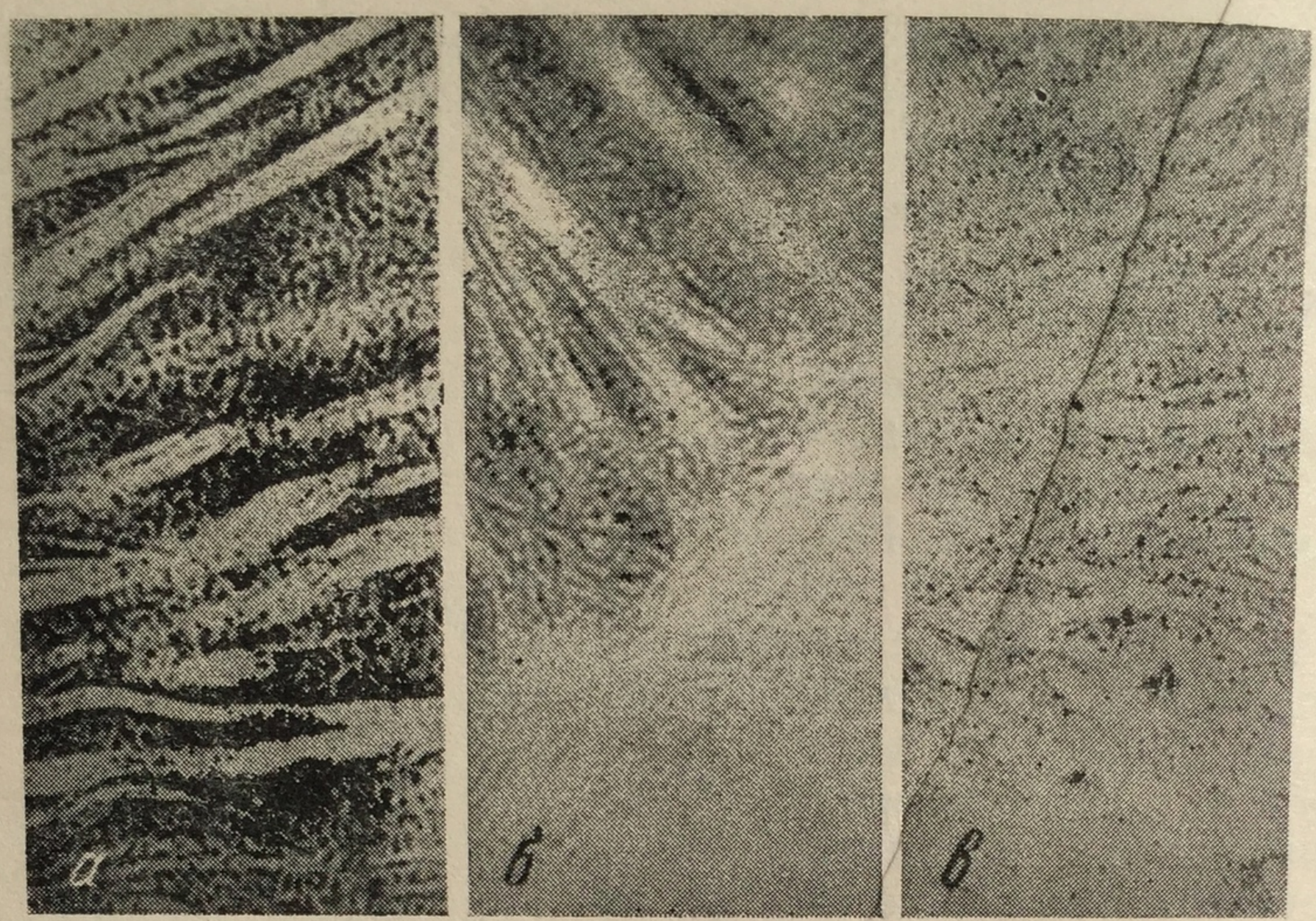


Рис. 26. Степень торможения холинэстеразы в мозгу мыши при действии 0,1 $ДЛ_{50}$ изомеркаптофоса и его метилсульфометилата (декапитация через 20 минут после введения).

а — контроль (декапитация неотравленной мышцы); *б* — декапитация после введения изомеркаптофоса; холинэстераза сильно угнетена (интенсивность окраски менее выражена, чем в контроле); *в* — декапитация после введения метилсульфометилата изомеркаптофоса; холинэстераза несколько угнетена. Ок. 5, об. 8. Фотографирование произведено при одинаковых условиях.

оказалось целесообразным вводить мышам не $ДЛ_{50}$, а только 0,1 или 0,25 указанной дозы. При этом выяснилось, что изомеркаптофос сильно угнетает холинэстеразу и в мышцах, и в мозгу, а метилсульфометилат изомеркаптофоса вызывает сильное угнетение холинэстеразы только в мышцах, в то время как в мозгу холинэстераза остается хорошо выраженной (рис. 26, 27).

Таким образом, перевод серы из двухвалентной в трехковалентную при метилсульфометилировании изомеркаптофоса вызывает сильные изменения в распределении вещества в организме. Эти изменения сходны с теми, которые происходят при метилсульфометилировании азотсодержащих холинолитических и холиномиметических веществ: по-видимому, резко ослабляется проникновение этих веществ в центральную нервную систему.

Schweitzer и др. (1939) именно на примере антихолинэстеразных веществ показали, что перевод третичного

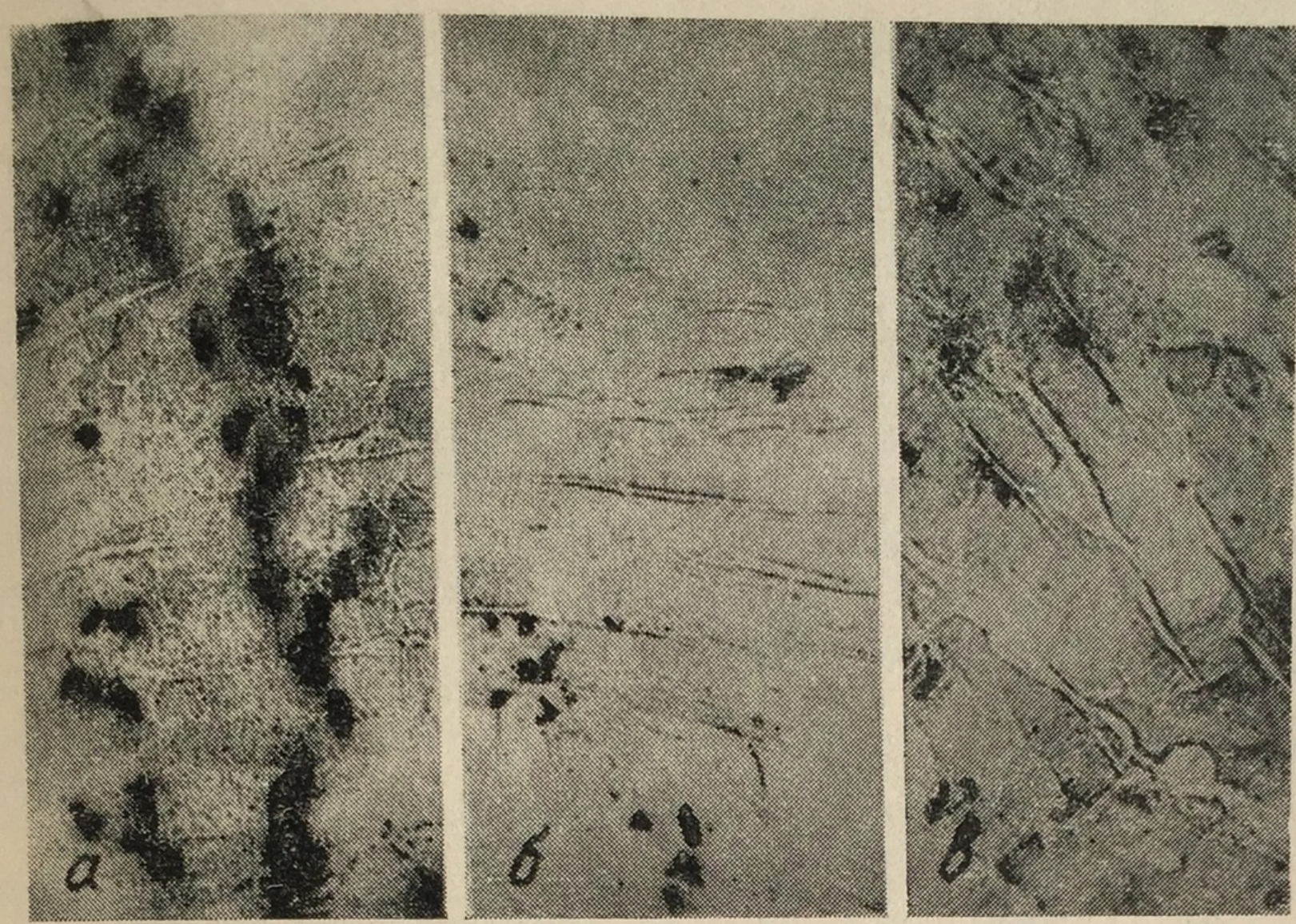


Рис. 27. Степень торможения холинэстеразы в мышцах мыши при действии 0,1 $ДЛ_{50}$ изомеркаптофоса и его метилсульфометилата (декапитация через 20 минут после введения).

а — контроль; *б* — декапитация после введения изомеркаптофоса: холинэстераза сильно угнетена (интенсивность окраски гораздо менее выражена, чем в контроле); *в* — декапитация после введения метилсульфометилата изомеркаптофоса: холинэстераза сильно угнетена. Ок. 5, об. 8. Фотографирование произведено при одинаковых условиях.

азота в четвертичный приводит к резкому изменению центрального действия, в частности исчезновению центрального стимулирующего эффекта, свойственного самому эзерину .

При исследованиях, проведенных И. В. Семеновым и Н. К. Фруентовым (1956, 1957), было установлено, что при метилсульфометилировании изомеркаптофоса его антихолинэстеразное действие in vitro усиливается в десятки раз.

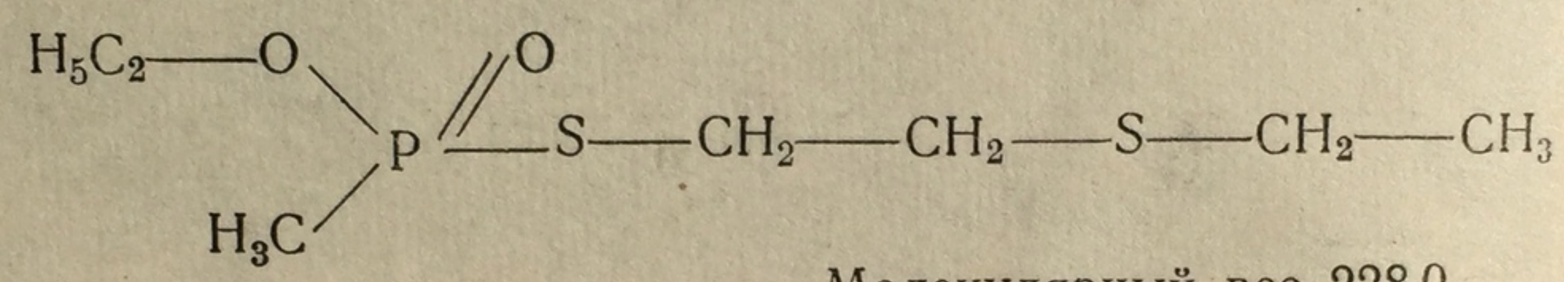
Так же сильно возрастает и периферическое фармакологическое действие (способность вызывать бронхоспазм): у метилсульфометилата антихолинэстеразные свойства оказались приблизительно в 21 раз сильнее, чем у исходного вещества, а способность вызывать бронхоспазм возросла в 25 раз.

Отравление препаратами Гд-7 и Гд-42. На примере метилсульфометилирования изомеркаптофоса мы показали, что оно приводит к увеличению его токсичности в 118

раз, причем значительно ослабляется его действие на холинэстеразу центральной нервной системы.

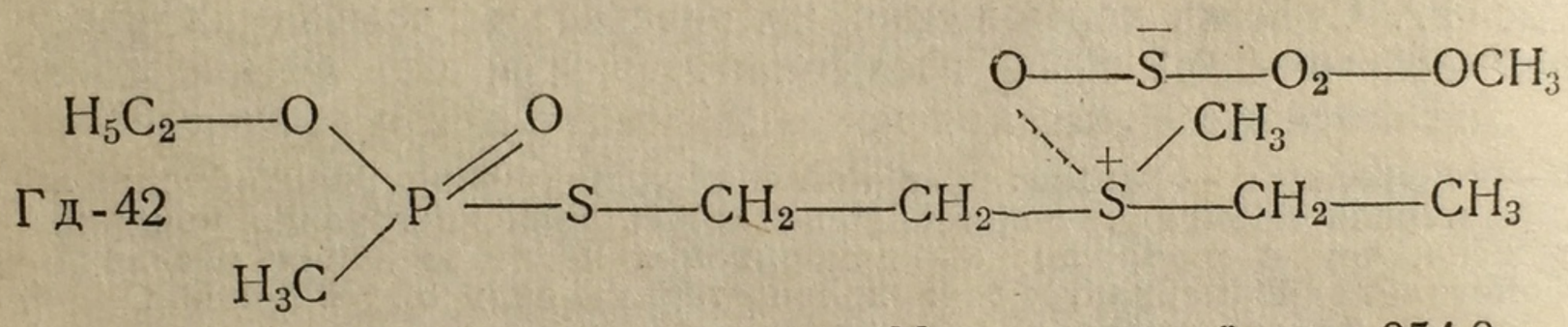
В связи с этим нам представлялось целесообразным проверить указанные закономерности на других серусодержащих ФОС. По нашей просьбе в лаборатории, руководимой М. И. Кабачником, Института элементоорганических соединений (дир.— акад. А. Н. Несмеянов) Н. Н. Годовиковым были синтезированы новые серусодержащие фосфорорганические соединения: Гд-7 (содержащий незаряженную двухвалентную серу) и его метилсульфометилат — Гд-42 (содержащий положительно заряженную трехковалентную серу).

Гд-7



Молекулярный вес 228,0

Гд-42



Молекулярный вес 354,0

Препарат Гд-7 — маслянистая, бесцветная прозрачная жидкость с сильным запахом, свойственным всем производным тиофосфорных и тиофосфиновых кислот. Температура кипения 117—118° (при 3 мм рт. ст.). Удельный вес при 20° 1,13. Фармакологически ранее не изучался. По данным Д. М. Пайкина и др. (1957), по токсичности для насекомых близок к тиофосу.

Препарат Гд-42 — сиропообразная бесцветная жидкость, хорошо растворимая в воде; фармакологически также впервые изучался в лаборатории, руководимой М. Я. Михельсоном. И. В. Семенов и Н. К. Фруентов (1958) изучили сравнительную силу тормозящего действия этих препаратов на истинную холинэстеразу и действие на периферические синапсы, оцениваемые по способности вызывать спазм бронхов. Они показали, что при метилсульфометилировании препарата Гд-7 происходит более выраженное усиление антихолинэстеразного действия и способности вызывать спазм бронхов: антихолин-

эстеразное действие возрастает приблизительно в 650 000 раз, а способность вызывать бронхоспазм — в 200 раз.

Мы поставили перед собой задачу изучить влияние перевода серы в молекуле фосфорорганического вещества из двухвалентной в трехвалентную, несущую положительный заряд, на соотношение антихолинэстеразного действия в головном мозгу и мышцах организма (Я. С. Смусин, 1958). Соотношение степеней торможения холинэстеразы в центральной нервной системе и в периферических тканях дает возможность судить о распределении изучавшихся антихолинэстеразных веществ в организме.

В опытах на белых мышах была установлена средняя смертельная доза, вызывающая смерть в течение первых суток при подкожном введении Гд-7 у 50% мышей. Эта доза оказалась равной 0,53 мг/кг, а для его метилсульфометилата (Гд-42) — 0,023 мг/кг веса, т. е. метилсульфометилирование усиливает токсичность исходного вещества в 23 раза.

Степень торможения активности холинэстеразы сравнивалась при действии равноэффектных доз обоих веществ ($ДЛ_{50}$ и $^1/_{10}$ $ДЛ_{50}$). Результаты, полученные по определению активности холинэстеразы и степени ее угнетения при отравлении препаратами Гд-7 и Гд-42 в дозе $ДЛ_{50}$, приведены в табл. 21 и на рис. 28.

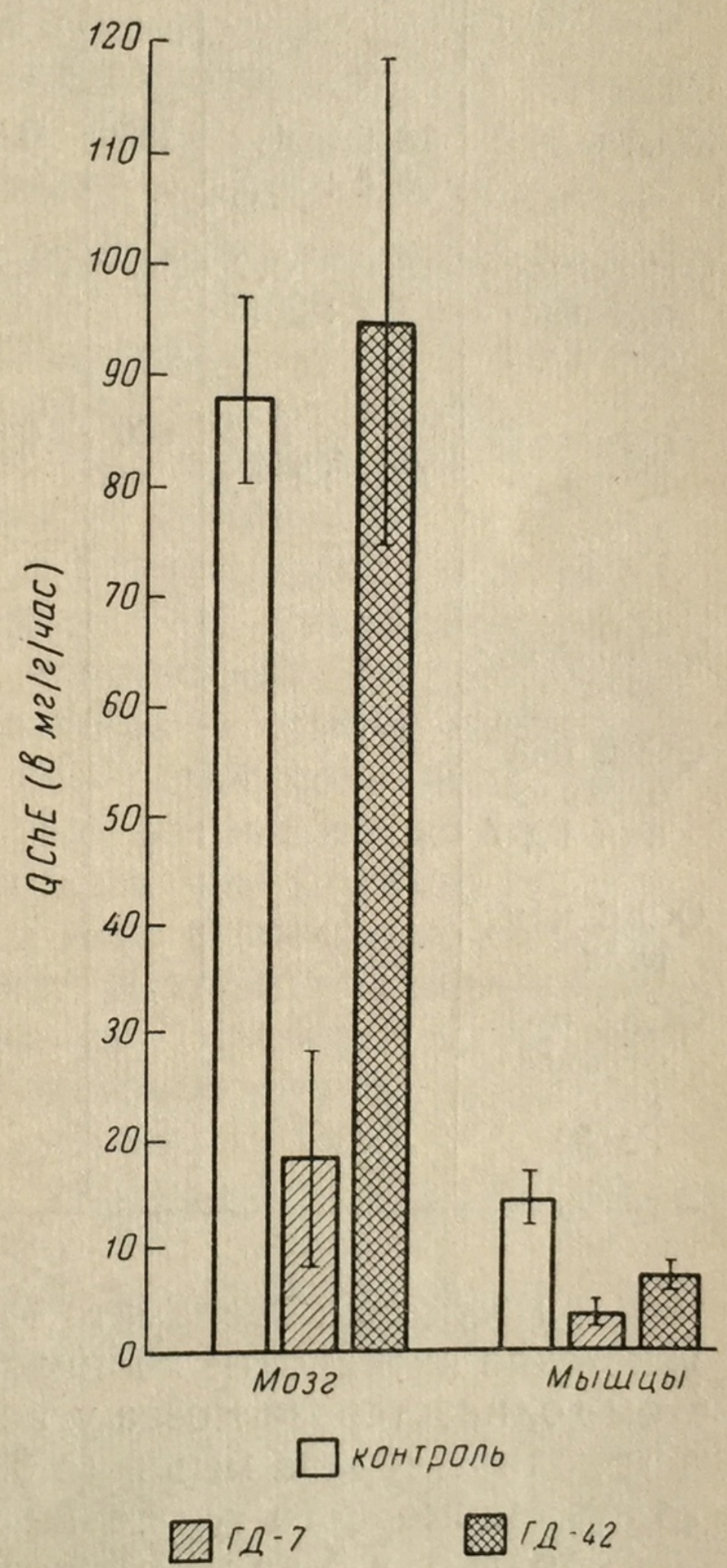


Рис. 28. Коэффициент активности холинэстеразы мозга и мышц белых мышей при отравлении препаратами Гд-7 и Гд-42 (объяснение см. в тексте).

Таблица 21

Коэффициент активности холинэстеразы (QChE) в головном мозгу и в мышцах белых мышей при отравлении $ДЛ_{50}$ препаратами Гд-7 и Гд-42 (в мг/г/час)

	Мозг	В %	Процент угнетения	Мышцы	В %	Процент угнетения	QChE мозга / QChE мышцы
Контроль	88,5± 4,2 80,5÷96,7	100	0	14,1± 1,1 11,8÷16,4	100	0	6,3
Отравление препаратом Гд-7	18,0± 3,7 7,7÷28,3	20,3	79,7	3,6±0,4 2,5÷4,7	26,5	74,5	5
Отравление препаратом Гд-42	95,1± 6,2 75,4÷114,8	100	0	7,2±0,4 5,9÷8,5	51,1	49,9	13,2
QChE контроля / QChE при отравлении Гд-7	49,2			3,1			
QChE контроля / QChE при отравлении Гд-42	1						

При действии препарата Гд-7 отмечается значительное угнетение активности холинэстеразы мозга и мышц. При этом холинэстераза мозга угнеталась сильнее (в 4,1 раза), чем холинэстераза мышц (в 3,1 раза). В результате такого неравномерного угнетения холинэстераза мозга оказалась только в 5 раз активнее холинэстеразы мышц, в то время как в контроле активность холинэстеразы мозга в 6,4 раза больше, чем в мышцах. При действии препарата Гд-42, наоборот, холинэстераза мозга не угнеталась, а холинэстераза мышц угнеталась в 3 раза. У животных,

отравленных препаратом Гд-42, холинэстеразная активность мозга в 13,2 раза превышает активность мышц.

Отсюда видно, что при отравлении белых мышей препаратом Гд-7 активность холинэстеразы головного мозга и мышечной ткани угнетена приблизительно одинаково (соответственно на 79,7 и 74,5%). При отравлении метилатом препарата Гд-7 (препарат Гд-42) активность холинэстеразы головного мозга совсем не угнеталась, а наблюдалось лишь снижение активности холинэстеразы мышечной ткани (на 48,9%). Тоже подтвердилось и при гистохимическом исследовании. Таким образом, на примере новой пары соединений подтвердилась та же закономерность, которую мы отмечали при изучении изомеркаптофоса и его метилсульфометилата. Сопоставление степени торможения веществами холинэстеразы в мозгу и в мышцах дает возможность судить об их распределении в организме. Тот факт, что препарат Гд-7 в одинаковой степени угнетает холинэстеразу мозга и холинэстеразу мышц, свидетельствует о равномерном распределении его в организме. Метилирование препарата Гд-7 (появление положительного заряда на сере) сопровождается некоторым снижением активности холинэстеразы только мышечной ткани. Холинэстераза мозга полностью сохранила свою активность. Отсюда следует, что полная ионизация препятствует проникновению вещества через гемато-энцефалический барьер из крови в мозг и несколько снижает его действие на холинэстеразу периферических тканей, в частности мышечной. Более того, препарат Гд-42 оказывается во много раз более токсичнее, чем препарат Гд-7 ($ДЛ_{50}$ в 23 раза меньше $ДЛ_{50}$ препарата Гд-7).

Менее четкие результаты получаются при действии препаратов в дозах $^1/_{10}$ $ДЛ_{50}$. Это, вероятно, связано с тем, что при таких дозах торможение было вообще слабо выражено, что затрудняет точное количественное сопоставление.

Наши данные по изучению степени угнетения активности холинэстеразы головного мозга и мышечной ткани белых мышей были подтверждены опытами, проведенными Л. Г. Магазаником (1959) по определению степени угнетения холинэстеразы в различных отделах мозга и в периферических тканях кошек при введении им минимальных бронхоспастических доз препаратов Гд-7 и Гд-42. Оказалось, что препарат Гд-7 почти нацело тормозит ак-

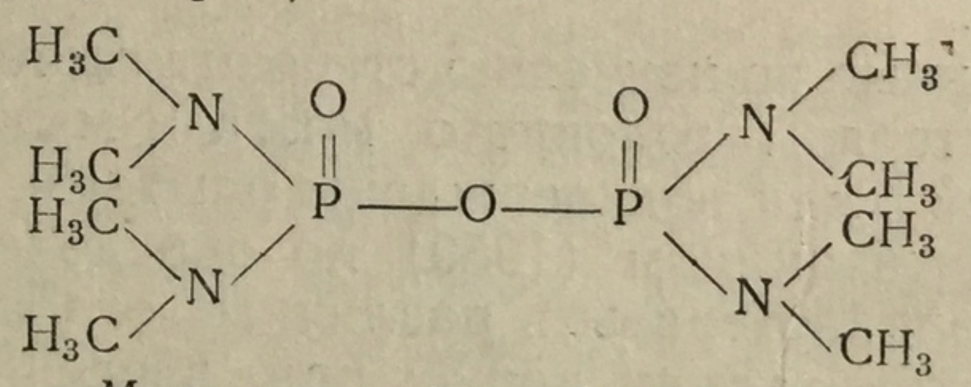
тивность холинэстеразы мозга, мышцы и крови. Препарат Гд-42 вызвал резкое угнетение холинэстеразы в периферических тканях (мышца, кровь), но в то же время почти не изменилась активность холинэстеразы различных отделов мозга. Учитывая высокую активность препарата Гд-42 в опытах in vitro, Л. Г. Магазаник полностью относит полученные им данные за счет особенностей распределения препарата в организме.

Аналогичные факты были получены Koelle, Steiner (1956) при изучении другой пары фосфорорганических соединений.

Э. В. Зеймаль и М. Я. Михельсон (1961), работая с препаратом Гд-42, показали, что при введении кошке внутривенно одной смертельной дозы препарата холинэстераза мозга оказывается совсем не угнетенной. Но если ввести стократную смертельную дозу, то отмечается значительное угнетение.

В разных отделах мозга угнетение весьма различно: например, в коре на 95%, а в хвостатом ядре всего на 25%. Из этого факта нельзя делать вывод, что гематоэнцефалический барьер для Гд-42 лучше выражен в области хвостатого ядра и слабее в области коры головного мозга, так как степень угнетения активности холинэстеразы при данной концентрации ФОС зависит от исходной активности холинэстеразы: степень торможения холинэстеразы тем больше, чем меньше исходная активность холинэстеразы. Авторы показали, что фактические концентрации препарата Гд-42 в разных отделах мозга практически остаются одинаковыми. Отсюда следует, что существенной разницы в проницаемости гемато-энцефалического барьера различных отделов мозга для сульфониевого ФОС Гд-42 не отмечается.

Отравление октаметилом. Одним из производных пирофосфорной кислоты является октаметил (октаметилтетраамидпирофосфат).



Молекулярный вес 286,24

Октаметил представляет собой жидкость без цвета

и почти без запаха. Водные растворы октаметила устойчивы к гидролизу. Удельный вес октаметила 1,399. Температура кипения 135—136° (при 1,5 мм рт. ст.). Октаметил смешивается во всех отношениях с водой и с большинством органических растворителей. За границей октаметил известен под названиями: ОМПА, пестокс-3, шрадан.

В настоящее время промышленность выпускает технический препарат, представляющий густую маслянистую жидкость темно-коричневого цвета со слабым запахом. Применяется в виде водных растворов (0,1—0,25%).

Du Bois, Doull и Coon (1950) установили, что октаметил не обладает заметным антихолинэстеразным действием, но в организме под влиянием фермента, содержащегося в печени, превращается в сильный ингибитор холинэстеразы. Другой отличительной чертой ОМПА является его неспособность проникать из крови в мозг (Frawley, Hagan, Fitzhugh, 1952). Поэтому его холинергическое действие ограничено периферическими тканями. Симптомов перевозбуждения холинергических структур центральной нервной системы при отравлениях октаметилом не бывает. Du Bois, Doill и Coon (1950) установили также, что активация октаметила происходит в процессе его окисления. Активация октаметила воспроизводится не только тканью печени, но и перманганатом калия (в молекуле октаметила аминогруппы переходят в амидооксидные) и хлором. Образующийся в результате окисления N-оксид обладает высокой антихолинэстеразной активностью.

Подобной активации печенью подвергаются также тиофос, метафос и меркаптофос (систокс). Триортокрезилфосфат также активируется в организме, это происходит в результате его изомеризации.

Октаметил в настоящее время находит все более широкое применение в СССР в качестве инсектицида (Н. Н. Мельников, 1953; Т. Е. Изотова и др., 1957; Е. А. Покровский и П. И. Митрофанов, 1955; П. И. Митрофанов, 1956; Ю. С. Каган, 1963). Он токсичен для теплокровных животных и человека. Действие на теплокровных животных связывают с антихолинэстеразными свойствами продукта превращения октаметила в организме (N-оксида). Опасность отравления октаметилом людей и сельскохозяйственных животных при использовании

его в качестве инсектицида требует изучения токсикологических свойств препарата, выяснения гигиенических условий труда, разработки соответствующих гигиенических норм (Т. Е. Изотова и др., 1955; В. С. Бурый, 1957; М. Е. Мачабели и др., 1957, и др.).

Октаметил способен проникать в организм через дыхательные пути, пищеварительный тракт, кожу и слизистые. Картина интоксикации характеризуется резким возбуждением холинергических структур (саливация, повышение возбудимости желудочно-кишечного тракта, судороги, фибриллярные подергивания мышц, расстройства координации движения) (В. С. Бурый, 1957).

Приводим данные по токсичности октаметила для различных животных (табл. 22).

Таблица 22

Токсичность октаметила для животных
(по Т. Е. Изотовой и др., 1955)

Вид животного	Метод введения октаметила	$ДЛ_{50}$, мг/кг	$ДЛ_{100}$, мг/кг
Белые мыши	Подкожно	9	20
Морские свинки	„	3—4	5
„ „	Перорально	3—4	5
„ „	На кожу	18	25
Кошки	Перорально	30	—
Собаки	Внутривенно	—	5

В. С. Бурый (1957) указывает, что абсолютной смертельной дозой химически чистого октаметила для крыс (самцов) при пероральном введении является доза 8—10 мг/кг. В. Д. Мдинарадзе (1957) приводит данные по токсичности октаметила для белых крыс и мышей: при пероральном введении $ДЛ_{50}$ для белых крыс составляет 8—10 мг/кг, для белых мышей — 19 мг/кг; $ДЛ_{100}$ для белых крыс — 10 мг/кг, для белых мышей — 24 мг/кг.

И. Д. Неклесова и М. А. Кудрина (1956) при изучении токсикологических свойств октаметила в опытах на различных животных обратили внимание на замедленное и длительное проявление отравления. Авторы, изучая влияние октаметила на кровяное давление и дыхание, наблюдали, что при введении октаметила в дозе 30—100 мг/кг внутривенно кошкам и собакам наступала

смерть животных от остановки дыхания (сердце «переживало» дыхание на 3 минуты).

Медицинская литература об октаметиле к настоящему времени весьма обширна.

В опытах И. В. Семенова (1958) октаметил в дозе 30 мг/кг приводил к развитию спазма бронхов на 50% через $1^1/_2$ часа после внутривенного введения препарата. И. В. Семенову в опытах по методу Концетт—Ресслера—Турпаева удалось проследить при длительном наблюдении постепенное нарастание бронхоспастического действия октаметила. Автор объясняет это прогрессирующим угнетением холинэстеразы в организме подопытного животного. В этих же опытах in vitro октаметил совсем не угнетал холинэстеразу.

В опытах на животных В. Д. Мдинарадзе (1959) наблюдал миоз, слюнотечение, брадикардию, повышение возбудимости, фибриллярное подергивание мышц, тремор, расстройства координации движений, судороги, изменения в содержании сахара в крови, нарушения условнорефлекторной деятельности, лейкоцитоз. На секции животных, погибших от отравления октаметилом, отмечали резкое полнокровие внутренних органов, расширение крупных и мелких сосудов, кровоизлияния, в печени и почках — дистрофические изменения, в головном мозгу — выраженный клеточный отек.

Ю. С. Каган и В. С. Бурый (1956) у людей с острым отравлением октаметилом после скрытого периода наблюдали брадикардию, иногда миоз, потоотделение, сонливость, стойкий красный дермографизм, местно — дерматиты, конъюнктивиты. При хронических отравлениях отмечаются головная боль, вялость, потеря аппетита, тошнота, похудание, брадикардия, артериальная гипотония, удлинение времени красного дермографизма (И. Я. Сосновик, 1959).

При изучении действия октаметила на активность холинэстеразы мы были вынуждены использовать технический препарат (из-за отсутствия чистого препарата). Мы отдавали себе отчет в том, что имеющиеся примеси в техническом препарате могут до некоторой степени извратить специфическое действие октаметила. Однако мы учитывали, что встречающиеся отравления человека и сельскохозяйственных животных вызываются преимущественно техническими препаратами октаметила, которые выраба-

тываются нашей промышленностью и нашли широкое применение в сельском хозяйстве в качестве инсектицидов.

Исследования мы проводили на кошках. Октаметил вводили внутримышечно в дозе 60 мг/кг (Я. С. Смусин, 1963).

Первые клинические явления отравления обычно отмечались через $1^1/_2$ часа после введения препарата в виде неустойчивости походки, резкой саливации, мочеотделения, дефекации, бокового положения. Затем присоединялись фибриллярные подергивания, выпячивание глазных яблок, слезотечение, паралич задних конечностей. Гибель животных, как правило, наступала через 12—24 часа после введения препарата.

В качестве контроля служили кошки, обездвиженные дитилином (1 мг/кг) и забитые кровопусканием.

Методом Хестрина исследовали активность холинэстеразы крови, сыворотки, миокарда, мышечной ткани, легких, печени, коры головного мозга, хвостатого ядра, среднего мозга, мозжечка, продолговатого и спинного мозга. Полученные результаты приведены в табл. 23 и на рис. 29.

Наши исследования показали, что при отравлении кошек октаметилом происходит значительное угнетение активности холинэстеразы крови, сыворотки и периферических органов и тканей — на 62,7—79,3% от исходного. Угнетение активности холинэстеразы тканей центральной нервной системы выражено значительно слабее: от 11,5% (хвостатое ядро) до 53,7% (мозжечок), но обычно — в пределах 30—50% от исходного. Таким образом, октаметил, введенный в организм животного, лишь через определенный скрытый период проявляет токсическое действие. Октаметил является сильным ингибитором холинэстеразы, оказывая антихолинэстеразное действие преимущественно на периферические ткани.

В силу своих физико-химических свойств октаметил плохо проникает в клетки мозга и не вызывает центральных эффектов, столь характерных для большинства ФОС (С. Н. Голиков и В. И. Розенгарт, 1960, 1964), в частности судорог и других симптомов действия яда на центральную нервную систему (Du Bois, Doull и Coon, 1950).

Наблюдаемое в наших опытах также угнетение холинэстеразы тканей центральной нервной системы (в сред-

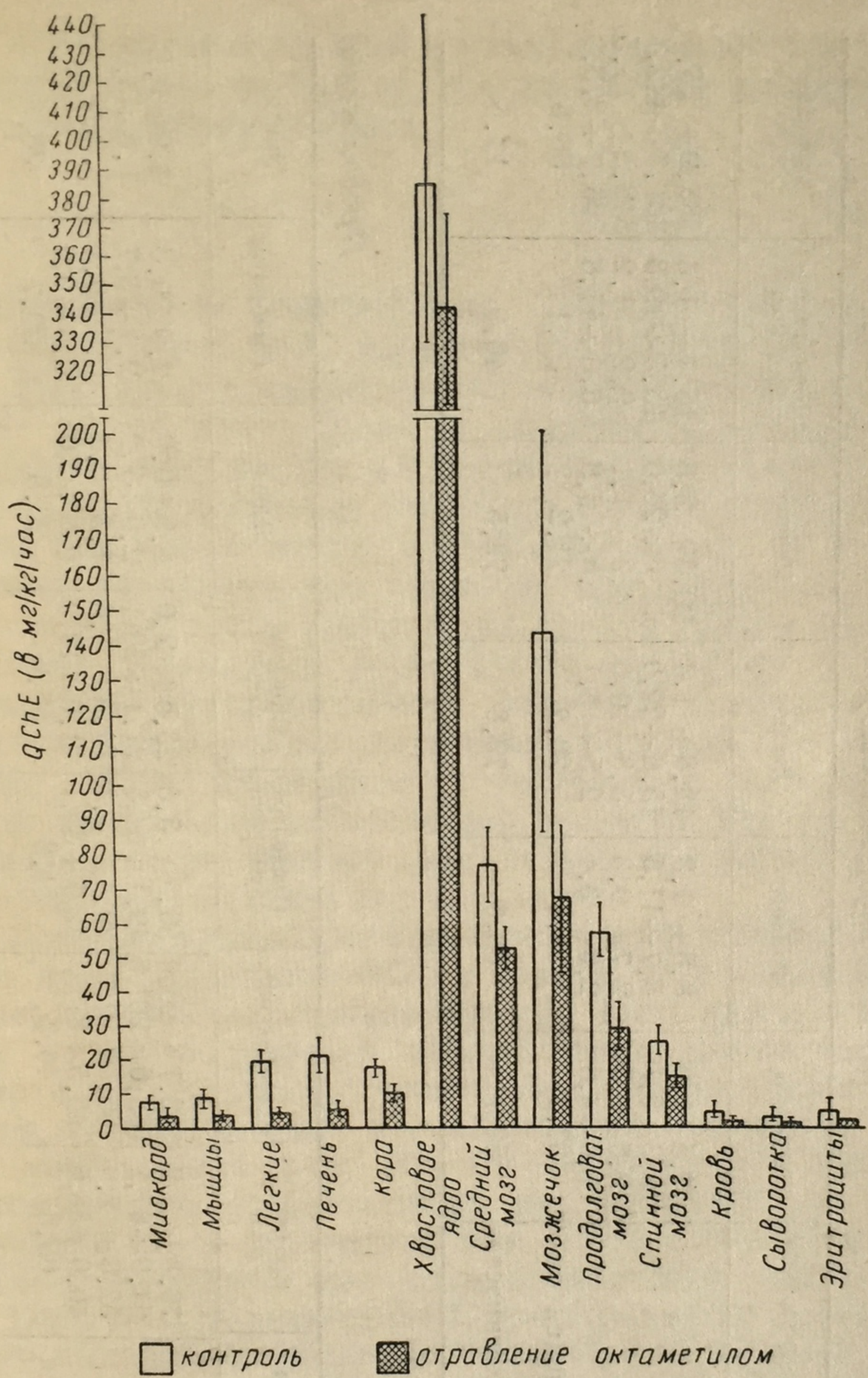


Рис. 29. Коэффициент активности холинэстеразы органов и тканей кошек при отравлении октаметилом (60 мг/кг).

нем на 30—50%), возможно, объясняется антихолинэстеразными свойствами примесей, содержащихся в техническом препарате октаметила, которым мы пользовались). Кроме того, известно (Kewitz и Nachmansohn,

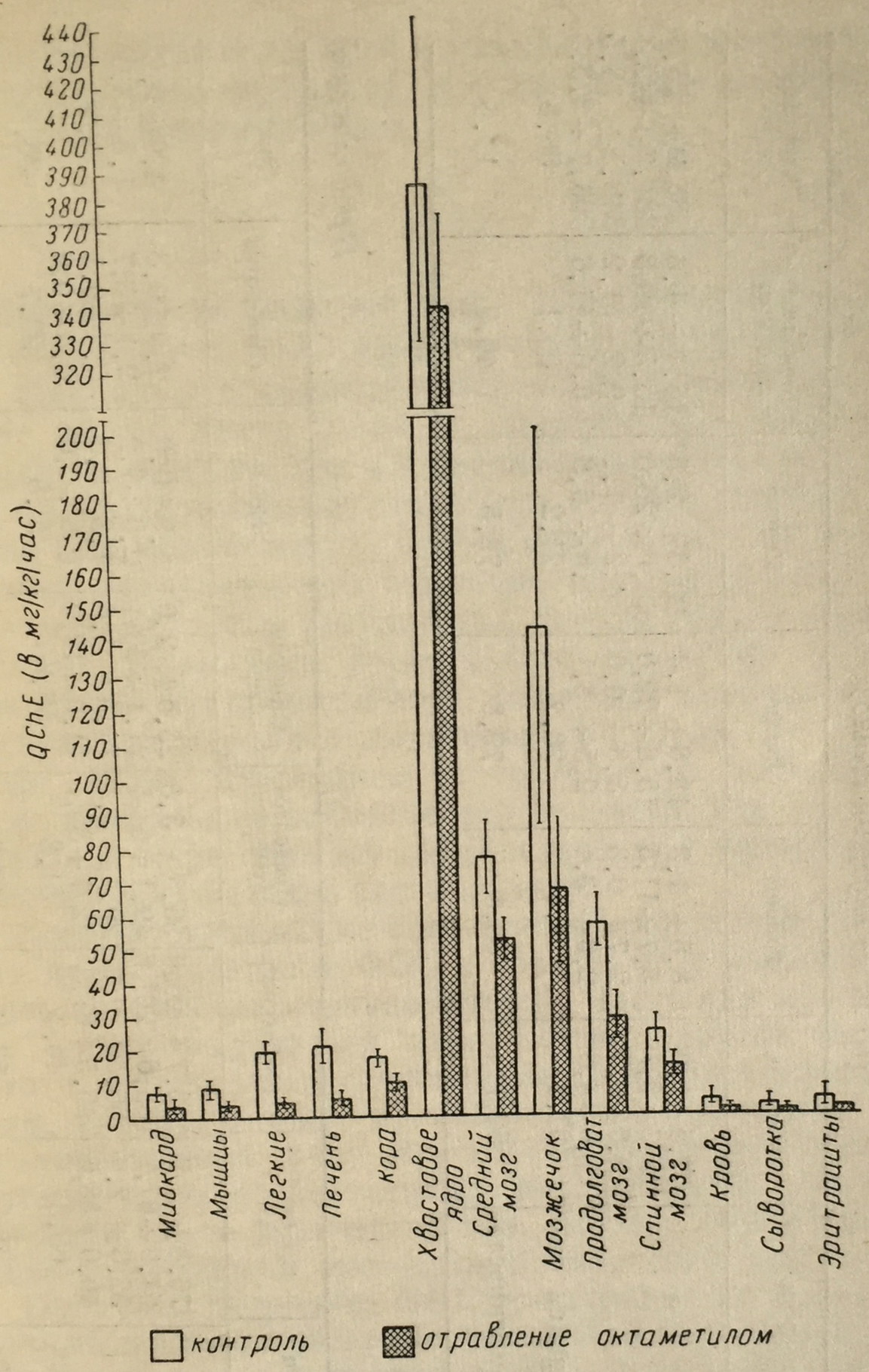


Рис. 29. Коэффициент активности холинэстеразы органов и тканей кошек при отравлении октаметилом (60 мг/кг).

нем на 30—50%), возможно, объясняется антихолинэстеразными свойствами примесей, содержащихся в техническом препарате октаметила, которым мы пользовались). Кроме того, известно (Kewitz и Nachmansohn,

Таблица 23

Коэффициент активности холинэстеразы (в мг/г/час) органов и тканей кошек при отравлении октаметилом
(60 мг/кг внутримышечно)

Коэффициент активности холинэстеразы	Миокард	Мышцы	Легкие	Печень	Кора головного мозга	Хвостатое ядро
Контроль	7,5±1,0 5,3÷9,7	8,6± 1,3 5,7÷11,5	18,8± 1,4 15,6÷22,0	20,3± 2,5 14,6÷26,0	16,4± 1,3 13,5÷19,3	386,9± 25,1 331,7÷442,1
Среднее	2,8±0,8 1,0÷4,6	2,7± 0,3 2,0÷ 3,4	3,8± 0,6 2,5÷ 5,1	4,3± 1,1 1,8÷ 6,8	9,2± 1,2 6,6÷11,8	342,5± 15,5 308,7÷376,3
Процент сохранившейся холинэстеразы	37,3	31,4	20,2	21,2	56,1	88,5
Процент угнетения холинэстеразы	62,7	68,6	79,8	78,8	43,9	11,5

Продолжение

Коэффициент активности холинэстеразы	Средний мозг	Мозжечок	Продолговатый мозг	Спинной мозг	Кровь	Сыворотка	Эритроциты
Контроль	76,3± 5,2 64,9÷87,7	143,7± 26,4 85,6÷201,8	56,8± 3,5 49,1÷64,5	25,6± 2,0 21,1÷30,1	4,9±0,9 2,6÷7,2	2,9±0,3 2,1÷3,7	4,9±1,2 1,8÷8,0
Среднее	52,3± 2,9 46,0÷58,6	66,5± 9,7 45,5÷87,5	29,4± 3,1 22,7÷36,1	14,5± 1,6 11,0÷18,0	1,3±0,3 0,6÷2,0	0,6±0,1 0,3÷0,9	1,9
Процент сохранившейся холинэстеразы	68,5	46,3	51,8	56,6	26,5	20,7	38,8
Процент угнетения холинэстеразы	31,5	53,7	48,2	43,4	73,5	79,3	61,2

1957), что октаметил, хотя и плохо проникает через гемато-энцефалический барьер, все же слабо угнетает активность холинэстеразы мозга.

*

* *

Возможность диагностики. Посмертные изменения при отравлениях ФОС характеризуются картиной асфиксии. Наибольшее дифференциально-диагностическое значение могут иметь миоз и спастические сокращения гладких мышц бронхов и кишечника. Отсутствие же этих признаков не позволяет отвергнуть отравление ФОС (особенно при молниеносной форме отравлений). К тому же следует учитывать, что асфиксия при отравлении ФОС не всегда является результатом только спазма бронхов, а может возникнуть в результате остановки дыхания вследствие курареподобного паралича диафрагмы или в результате паралича дыхательного центра (De Candole и др., 1953). Последнее обстоятельство, по-видимому, имеет наибольшее значение для человека. Все это в значительной мере снижает диагностическую ценность морфологических методов исследования.

Фосфорорганические соединения относятся к сильнейшим ядам (некоторые ФОС в дозе 50 мг и меньше могут привести к гибели отравившегося). Часть яда может еще при жизни выделиться из организма, другая часть до смерти подвергается в организме различным превращениям, наконец, может произойти разложение яда в результате гниения трупа. Все эти обстоятельства приводят к тому, что в исследованных внутренностях (1—2 кг) окажется такое количество яда, которое определить судебно-химическими методами практически невозможно.

Продукты гидролиза ФОС при выживании пострадавшего выделяются экскрементами. При отравлении такими веществами, как тиофос, фосфакол, метафос, армин и др., освобождающийся в процессе их гидролиза паранитрофенол выделяется с мочой и может быть определен количественно. Исследование мочи на паранитрофенол у отравленных ФОС может иметь лишь вспомогательное значение (для уточнения химической структуры яда, вызвавшего отравление). Для целей альтернативной диагностики отравлений ФОС исследования на паранитрофенол не пригодны, так как большое количество широко

распространенных ФОС паранитрофенола в своем составе не содержит.

Неоднократно предпринимавшиеся попытки построить диагностику отравлений на обнаружении в тканях пострадавшего избытка фосфора не имеют под собой реальной почвы. Фосфор — необходимый компонент ткани живого организма. Попадание в организм в составе ФОС нескольких миллиграммов фосфора ни в какой мере не может повлиять на баланс соединения фосфора в тканях.

Таким образом, судебно-химические методы определения отравлений ФОС весьма ограничены; с их помощью очень трудно установить характер яда, вызвавшего смерть.

Наиболее адекватными и единственно надежными критериями судебно-медицинской диагностики отравлений ФОС (как прижизненной, так и посмертной) являются методы определения холинэстеразной активности крови пострадавшего или тканей трупа.

Холинэстеразная активность тканей крайне медленно изменяется после смерти и, как правило, только по мере разложения трупа. Поэтому активность холинэстеразы долгое время остается такой, какой она была в момент смерти. Необратимое угнетение активности холинэстеразы ФОС дает возможность очень точного определения активности холинэстераз в различных тканях трупа даже через длительные сроки после смерти.

Для судебно-медицинской диагностики весьма важно изучить действие веществ, неравномерно распределяющихся в организме, в частности препаратов, не проникающих из крови в мозг и тем самым не способных вызывать угнетение активности холинэстеразы в центральной нервной системе (октаметил, изомеркаптофос, метилсульфометилат изомеркаптофоса, препараты Гд-7 и Гд-42 и др.).

Одни из этих препаратов (фосфакол, изомеркаптофос и препарат Гд-7) одинаково сильно угнетают активность холинэстеразы как в центральной нервной системе, так и в периферических тканях — на 70—90%. Другие препараты (армин) преимущественно угнетают активность холинэстеразы центральной нервной системы (на 80—90%) и в меньшей мере (хотя тоже сильно) — холинэстеразу периферических тканей. Наконец, третья группа

препаратов (метилсульфометилат изомеркаптофоса, препарат Гд-42, октаметил), введенных в организм в смертельных дозах, вызывает сильное угнетение активности холинэстеразы периферических тканей (в пределах 50—90%) и очень слабо или совсем не угнетает холинэстеразу центральной нервной системы.

Несильно выраженное угнетение активности холинэстеразы центральной нервной системы при отравлении некоторыми, практически не способными проникать в мозг ФОС (октаметил), возможно, зависит от наличия примесей к препарату. В некоторых случаях отравления октаметилом угнетение активности холинэстеразы мозга может зависеть от того, что в организм попало очень много яда, так много, что какая-то часть его все же проникла через гемато-энцефалический барьер (Michelson, Zeimal, Magazanik, Kabachnik и Godovicov, 1961).

Экспериментальные данные подтверждают возможность использования в судебно-медицинской диагностике отравлений не только самого факта снижения холинэстеразной активности, но и избирательности этого антихолинэстеразного действия по отношению к разным тканям. Это позволит диагностировать не только отравление антихолинэстеразным веществом вообще, но и определить тип данного вещества и т. д. Установление степени угнетения истинной и ложной холинэстераз в разных тканях может дать еще более детальный материал для определения яда, вызвавшего смерть.

Отсюда следует, что во всех случаях, когда имеется подозрение на отравление ФОС, необходимо исследовать уровень активности холинэстеразы как в головном мозгу, так и в периферических тканях.

В литературе имеется сообщение об установлении отравления человека антихолинэстеразным веществом по степени угнетения холинэстеразы эритроцитов и межреберной мышцы на трупе (Petti, 1958). Это был случай отравления рабочего, обслуживавшего самолеты, опыляющие поля систокосом, содержащим 26,2% 0,0-диэтил-0-2-этилмеркаптоэтилфосфата. Исследование производилось методом посмертного определения активности холинэстеразы.

Автор нашел резкое подавление активности холинэстеразы эритроцитов и уменьшение окраски при гистохимическом исследовании межреберной мышцы. О том,

что остаточная окраска свидетельствовала о частично сохранившейся активности холинэстеразы, указывало ее полное исчезновение после предварительной обработки ДФФ. Способность систокса угнетать активность холинэстеразы в мышцах подтверждена автором опытами по инкубации нормальной мышцы в парах инсектицида, а также при экспериментальном отравлении крыс. Учитывая многочисленные аварии самолетов с гибелью летчиков при опрыскивании ФОС, автор подчеркивает большое судебно-медицинское значение методов определения активности холинэстеразы.

В настоящее время подобные случаи не являются большой редкостью. Остановимся на одном из случаев, который встретился в нашей практике (А. М. Бухмастова и Я. С. Смусин, 1963).

Гр-н П., 66 лет, работая в коллективном саду, 12 апреля 1962 г. попробовал на язык жидкость, предназначенную для опрыскивания деревьев (как несколько позже выяснилось, 30% раствор НИУИФ-100). Через 30 минут почувствовал себя плохо, внезапно упал, началась рвота, непроизвольная дефекация и быстро наступила потеря сознания. В крайне тяжелом состоянии был доставлен в больницу. При поступлении отмечено: сознания нет, кожа покрыта холодным потом, синюшна; зрачки сужены, на свет не реагируют; пульс 20 ударов в минуту, едва уловим, кровяное давление 120/30 мм рт. ст., затем упало до 60/20 мм; дыхание редкое (10 в минуту), поверхностное, клокочущее; челюсти крепко сжаты; изо рта — выделения пенистой жидкости. Больной обложен грелками, произведено промывание желудка, внутривенно введены глюкоза, строфантин, затем физиологический раствор, цититон, адреналин, даны настой валерианы, кодеина, теплое молоко с содой, однако состояние больного прогрессивно ухудшалось, и через 5 часов после приема яда последовала смерть.

При судебно-медицинском исследовании трупа, произведенном через 2 суток, найдено: трупные пятна обильные, розовато-фиолетового цвета; трупное окоченение выражено во всех группах мышц; зрачки сужены. В полостях сердца и крупных сосудах — жидкая кровь; миокард дряблый с обширным рубцом в задней стенке левого желудочка, окруженным мелкими кровоизлияниями; атеросклероз аорты, венечных артерий сердца и артерий головного мозга. В просвете дыхательных путей — большое количество слизи, отек и гиперемия слизистых оболочек. Легкие увеличены, в задних отделах — участки уплотнения темно-красного цвета, со множественными кровоизлияниями. В желудке — серовато-грязноватого цвета содержимое с запахом прелого сена. Поверхность почек мелкозернистая. Со стороны головного мозга и других внутренних органов отмечается венозное полнокровие.

Гистологическим исследованием установлены атеросклероз артерий сердца, почек и головного мозга, диффузный кардиосклероз, рубцы миокарда, крупные очаги размягчений в веществе головного

Таблица 24

Определение процента угнетения активности холинэстеразы органов и тканей трупа гр-на П., 66 лет. Температура в термостате 38°

Объект исследования / Разведение / Ход исследования	Кровь [1]		Миокард	Поджелудочная железа	Щитовидная железа	Мышцы	Легкие
Разведение	1:8		1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
	1	2	3	4	5	6	7
Фосфатный буфер 7,8 (в мл)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Дистиллированная вода (в мл)	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Гомогенат (в мл)	1	1	1	1	1	1	1
Прозерин 1% (в мл)	0,1						
Ацетилхолин 0,4% (в мл)	1	1	1	1	1	1	1
Время контакта (в минутах)	30	30	30	30	30	30	30
Трихлоруксусная кислота 25%	1	1	1	1	1	1	1
E_0	0,354	0,276	0,322	0,323	0,321	0,289	0,276
$E_к$	0,019	0,019	0,020	0,021	0,020	0,020	0,020
$E_0—E_к$	0,335	0,257	0,302	0,302	0,301	0,245	0,269
Процент сохранения ацетилхолина	100	76,7	90,2	90,2	90,1	73,1	80,3
Процент разрушения ацетилхолина	0	23,3	9,8	9,8	9,9	26,9	19,7
QChE (в мг/г/час)		13,4	3,5	3,5	3,6	9,7	7,1
QChE при скоропостижной смерти от заболеваний сердечно-сосудистой системы		29,3±2,7	10,9±1,7	12,1±2,2	13,1±2,7	20,5±1,4	20,3±2,1
Процент сохранившейся холинэстеразы		45,7	32,1	29,0	27,5	47,3	35,0
Процент угнетения холинэстеразы		54,3	67,9	71,0	72,5	52,7	65,0

[1] Гемолиз

Продолжение табл. 24

Объект исследования / Разведение / Ход исследования	Печень	Кора головного мозга	Хвостатое ядро	Гипоталамус	Мозжечок	Продолговатый мозг	Спинной мозг
	1 : 5	1 : 5	1 : 75	1 : 10	1 : 15	1 : 5	1 : 5
	8	9	10	11	12	13	14
Фосфатный буфер 7,8 (в мл)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Дистиллированная вода (в мл)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Гомогенат (в мл)	1	1	1	1	1	1	1
Прозерин 1% (в мл)							
Ацетилхолин 0,4% (в мл)	1	1	1	1	1	1	1
Время контакта (в минутах)	30	30	30	30	30	30	30
Трихлоруксусная кислота 25%	1	1	1	1	1	1	1
E_0	0,311	0,267	0,267	0,244	0,301	0,257	0,300
$E_к$	0,022	0,020	0,020	0,020	0,023	0,022	0,026
$E_0—E_к$	0,254	0,291	0,236	0,224	0,277	0,235	0,274
Процент сохранения ацетилхолина	75,8	86,9	70,4	66,9	82,7	70,1	81,8
Процент разрушения ацетилхолина	24,2	13,1	29,6	33,1	17,3	29,9	18,2
QChE (в мг/г/час)	8,7	4,7	159,8	23,8	18,7	10,8	6,6
QChE при скоропостижной смерти от заболеваний сердечно-сосудистой системы	32,9±7,9	15,7±2,0	275,8±27,9	38,8±4,1	54,4±11,3	23,8±2,3	15,7±2,1
Процент сохранившейся холинэстеразы	26,4	30,0	57,9	61,3	34,4	45,4	42,0
Процент угнетения холинэстеразы	73,6	70,0	42,1	38,7	65,6	54,6	58,0

мозга, полнокровие и множественные мелкие периваскулярные кровоизлияния; очаги кровоизлияний в альвеолы легких, очаговая пневмония; некротический нефроз, геморрагический панкреонекроз; полнокровие селезенки с гиалинозом сосудов.

При судебно-химическом исследовании во внутренних органах и в промывных водах яд не обнаружен.

Таким образом, в клинической картине отравления отмечались: потеря сознания, падение кровяного давления, брадикардия, урежение дыхания, миоз, выделение пенистой жидкости изо рта, усиленное потоотделение, непроизвольная дефекация, т. е. признаки, характеризующие перевозбуждение парасимпатического отдела нервной системы. На это также указывают данные исследования трупа: миоз, признаки асфиксии, острая эмфизема легких, наличие большого количества пенистой жидкости в просвете дыхательных путей, отек легких и слизистых оболочек дыхательных путей.

Клиническая картина отравления, данные вскрытия и результаты гистологического исследования внутренних органов не давали достаточных оснований к составлению судебно-медицинского заключения о причине смерти.

Мы провели дополнительные исследования по определению активности холинэстеразы крови, органов и тканей, изъятых из трупа. Определения проводились биохимическим методом Хестрина (табл. 24). Результаты этих исследований сравнивали с уровнем активности холинэстеразы при скоропостижной смерти от заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Из табл. 24 видно, что в исследуемом случае наблюдалось значительное угнетение холинэстеразной активности крови, миокарда, поджелудочной и щитовидной желез, мышечной ткани, легких, печени и различных отделов центральной нервной системы (коры головного мозга, хвостатого ядра, гипоталамуса, мозжечка, продолговатого и спинного мозга) в пределах 38,7—73,6%. Это угнетение фермента наблюдалось как в органах, содержащих лишь истинную или ложную холинэстеразу, так и в органах, содержащих оба вида фермента.

Приведенные данные дали право заключить, что смерть последовала от отравления антихолинэстеразным веществом, вызывающим сильное угнетение активности холинэстеразы как центральной нервной системы, так и периферических тканей. Именно к этой группе соединений и относится тиофос, входящий в состав инсектицида НИУИФ-100.

Таким образом, исследование активности холинэстеразы крови, органов и тканей трупов может быть использовано для судебно-медицинской диагностики отравлений антихолинэстеразными веществами.

Глава V

ОТРАВЛЕНИЯ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ОБРАТИМОГО ДЕЙСТВИЯ И ИХ ПОСМЕРТНАЯ ДИАГНОСТИКА

Торможение холинэстераз ингибиторами обратимого типа действия гораздо труднее оценить количественно, чем необратимое торможение, вызванное фосфорорганическими веществами.

Необратимое торможение сохраняется в полной мере после смерти и не изменяется при всех процедурах приготовления ткани для измерения ее холинэстеразной активности.

В случае обратимо действующих ингибиторов возможно восстановление активности холинэстераз тканей в процессе приготовления экстрактов, необходимых для определения активности.

Действительно, все общепринятые методы определения активности холинэстераз связаны с разведением исследуемой ткани. В процессе приготовления экстракта и самого определения холинэстеразы ткань разводится в десятки раз. Естественно, что при этом и концентрация ингибитора тоже снижается в десятки раз. Если торможение легко обратимо, то восстановление активности холинэстеразы, хотя бы частичное, может произойти и даже неминуемо должно произойти в процессе приготовления тканевых экстрактов и последующего определения их ферментативной активности. Это сильно затрудняет определение степени торможения активности холинэстеразы обратимыми ингибиторами. Торможение, которое удается уловить в экстрактах тканей, как правило, меньше того, которое было in vivo во время самого отравления. Насколько ослабло торможение, судить трудно. Это зависит от степени обратимости торможения, от скорости и легкости диссоциации комплексного соединения энзима с ингибитором. Для прозерина эта скорость невелика, и в тканях животных, отравленных прозерином, обычно

удается отметить сниженную активность холинэстеразы. При торможении холинэстераз таким веществом, как этиловый спирт, скорость восстановления активности энзима, наоборот, очень велика. Как только ткань разводится при приготовлении экстракта и концентрация спирта снижается, сейчас же активность холинэстераз восстанавливается и приходит в соответствие с новой (более низкой) концентрацией спирта.

Поэтому, когда речь идет об ингибиторах обратимого типа действия, практически очень трудно точно установить, насколько была заторможена холинэстераза in vivo. Таких ингибиторов много, и отравления обратимыми ингибиторами могут встречаться часто.

Есть очень много веществ, обладающих способностью обратимо угнетать холинэстеразу. Для некоторых из них (прозерин, эзерин, нивалин, магнолин и др.) антихолинэстеразное действие является главным. Оно лежит в основе токсического эффекта при отравлении большими дозами этих веществ. Однако для большинства из них антихолинэстеразное действие является второстепенным и не играет значительной (а иногда и никакой) роли при отравлении большими их дозами (стрихнин, морфин, наркотики и др.). При их токсических дозах торможение холинэстераз in vivo может быть довольно сильным. Однако антихолинэстеразное действие этих веществ, видимо, не имеет большого значения в механизме их токсического действия.

Тем не менее возможность определять количественно степень угнетения холинэстеразы при отравлениях морфином или наркотиками может дать ценный материал для судебно-медицинских целей. Если холинэстераза окажется угнетенной, то это будет доводом в пользу того, что произошло отравление каким-то из веществ, способных угнетать холинэстеразы. Если холинэстераза не угнетена в тканях трупа, то это будет свидетельствовать об отсутствии отравления веществами антихолинэстеразного действия. Локализация антихолинэстеразного эффекта (мозг, периферические ткани и т. д.) даст дополнительный материал. Все это указывает на то, что возможность определять степень торможения холинэстеразы тканей при отравлении ингибиторами обратимого действия позволит иметь ценные вспомогательные сведения для судебно-медицинской диагностики.

Исходя из приведенных выше соображений, мы попытались выяснить возможность количественного определения активности холинэстераз в тканях при отравлении веществами, обладающими способностью обратимо угнетать эти энзимы.

Отравления эзерином и прозерином. В судебно-медицинской практике встречаются случаи смертельных отравлений эзерином и прозерином (Р. И. Кандибур, 1958, и др.).

Естественный алкалоид физостигмин (эзерин) — действующее начало калабарских бобов, произрастающих в Африке. Наиболее употребительна его салициловокислая соль. Это мелкие бесцветные кристаллы, растворимые в воде. Растворы нестойки и при хранении буреют, теряя активность. Физостигмин химически представляет собой метилированный сложный эфир карбаминовой кислоты и азотсодержащего ароматического спирта.

Из синтетических заменителей эзерина наибольшее практическое значение получил прозерин, представляющий собой метилсульфат диметилкарбаминового сложного эфира оксифенилтриметиламмония. Это белый или слегка желтоватый кристаллический порошок, хорошо растворимый в воде.

Выше был рассмотрен вопрос о механизме тормозящего действия эзерина и прозерина на холинэстеразу. В табл. 25 приведены данные о тормозящем действии

Таблица 25

Эффект эзерина (10^{-6} М) на гидролиз холиновых эстеров и трибутирина под влиянием гомогенатов человеческого мозга (по *Ord* и *Thompson, 1952*)

Источник энзима	Торможение (в %)	
	холиновый эстер	трибутирин
	Buch	
Чечевичное ядро	82	8
Хвостатое ядро	96	2
Белое вещество подкорки	80	8
	Ach	
Мозжечок	93	11
Серое вещество коры	97	22

эзерина на холинэстеразы различных отделов мозга человека in vitro (Ord и Thompson). Эзерин в высоких разведениях (10^{-6} M) сильно тормозит истинную холинэстеразу (гидролиз ацетилхолина — Ach) и неспецифическую холинэстеразу (гидролиз бутирилхолина — Buch). Действие это избирательно. Гидролиз нехолиновых эстеров, например трибутирина, тормозится очень незначительно.

Основные явления, наблюдаемые при действии эзерина, объясняются его антихолинэстеразным действием (Loewi и Navratil, 1926): ацетилхолин, выделяющийся на концах холинергических нервов, не разрушается, а накапливается и вызывает эффекты, соответствующие возбуждению этих нервов.

При резорбтивном действии эзерина на первый план выступают явления возбуждения М-холинореактивных систем, т. е. явления, соответствующие возбуждению постганглионарных холинергических нейронов парасимпатических, а также некоторых симпатических нервов: наступают сужение зрачков, слюнотечение, усиление перистальтики, жидкий стул, замедление ритма сердца, усиление сокращений матки. Накопление ацетилхолина происходит и в области окончаний преганглионарных нервов, реагирующих с Н-холинореактивными системами. Поэтому при резорбтивном действии эзерина наблюдается возбуждение ганглиев, а также повышение выхода адреналина из надпочечников.

Токсические дозы эзерина приводят к самоотравлению организма накапливающимся в чрезмерных количествах ацетилхолином. При введении отравляющих доз эзерина, кроме перечисленных выше явлений, развиваются характерные подергивания скелетной мускулатуры, которые продолжаются некоторое время и после смерти.

В общей картине отравления эзерином отмечаются также явления со стороны центральной нервной системы (рвота, общее возбуждение, судороги), что объясняется чрезмерным накоплением ацетилхолина в тканях мозга.

При действии очень больших доз эзерина не исключена возможность и прямого его воздействия на холинореактивные системы (В. М. Карасик, 1946; А. Г. Гинецинский и З. И. Барбашова, 1949; П. Е. Дяблова, 1950, и др.).

Прозерин по действию очень близок к физостигмину; он отличается меньшей токсичностью для центральной нервной системы и более сильным действием на скелетную мускулатуру. У прозерина сильнее выражено прямое действие на холинореактивные системы.

Многочисленные исследования показывают, что известные эффекты эзерина и прозерина можно понять в основном как результат инактивации холинэстераз. При умеренной степени инактивации наблюдаются облегчение синаптического проведения и явление возбуждения как в центральной нервной системе, так и в ее вегетативных отделах. При чрезмерном угнетении возможно ослабление и полное нарушение проведения — паралитические состояния.

Рассматривая характерные черты действия эзерина и прозерина, Feldberg (1945) приходит к следующим выводам: 1) действие эзерина и прозерина на различные органы наблюдается только тогда, когда в этих органах происходит выделение ацетилхолина; 2) действие эзерина и прозерина характеризуется длительным скрытым периодом, медленным развитием и медленным исчезновением по сравнению с действием самого ацетилхолина; 3) все эффекты эзерина и прозерина снимаются атропином или кураре; 4) изменения в структуре молекулы, лишающие эзерин способности тормозить холинэстеразу, приводят и к потере биологического действия (Schweitzer и др., 1939).

Интерес представляет работа Krayer, Coldstein и Plachte (1944), посвященная определению степени угнетения холинэстеразы при действии эзерина in vivo. Авторы показали, что в опытах с однократной инъекцией эзерина определить степень торможения холинэстеразы очень трудно даже в крови.

М. Я. Михельсон (1948), анализируя работы приведенных авторов, считает, что источником ошибок в таких опытах могут служить, с одной стороны, медленность установления равновесия между энзимом и ингибитором, а с другой — быстрый выход эзерина из крови в ткани.

Более точное представление о степени торможения активности холинэстеразы можно получить в опытах с длительной внутривенной инфузией ингибитора. Однако и в этих опытах остается много источников ошибок.

Мы попытались найти методические возможности определения степени угнетения холинэстераз в тканях животного in vivo при действии эзерина и прозерина (Я. С. Смусин, 1963).

При работе гистохимическим методом мы обратили внимание на то, что у животных, отравленных веществами, обратимо угнетающими холинэстеразу, все же выявляется сильное торможение активности энзима в тканях (Я. С. Смусин, 1955). Поэтому мы решили использовать прежде всего гистохимический метод. При этом методе не происходит гомогенизации и разведения исследуемой ткани, как при биологических и биохимических методиках определения холинэстеразы. Ткань остается в виде интактного кусочка (среза) и только омывается раствором, содержащим соответствующие реагенты. Реакция протекает в кусочке неразведенной ткани (срезе). Поэтому были основания надеяться, что при гистохимическом определении активности холинэстеразы легче будет выявить торможение обратимыми ингибиторами, чем при обычных методах.

Опыты проводились на белых мышах. В опытах in vivo эзерин и прозерин вводили мышам подкожно в дозах соответственно 1 и 0,5 мг/кг. Гибель животных обычно наступала через 7—10 минут после введения препаратов.

Активность холинэстеразы исследовали гистохимическим методом Келле и Фриденвальда в опытах как in vivo, так и in vitro.

При микроскопическом исследовании гистохимических препаратов головного мозга, продолговатого мозга и мышечной ткани мышей, отравленных эзерином и прозерином, отмечалось умеренное окрашивание срезов ацетилтиохолином, выявляющим истинную холинэстеразу. Однако в действии эзерина и прозерина наблюдались и различия: если при отравлении животных эзерином наиболее слабо окрашивалась ацетилтиохолином ткань центральной нервной системы и несколько лучше мышечная ткань, то при отравлении животных прозерином, наоборот, лучше окрашивалась ткань центральной нервной системы и слабее — мышечная ткань (рис. 30 и 31). Отсюда следует, что эзерин (в противоположность прозерину) лучше проникает в центральную нервную систему, а потому сильнее угнетает холинэстеразу мозга.

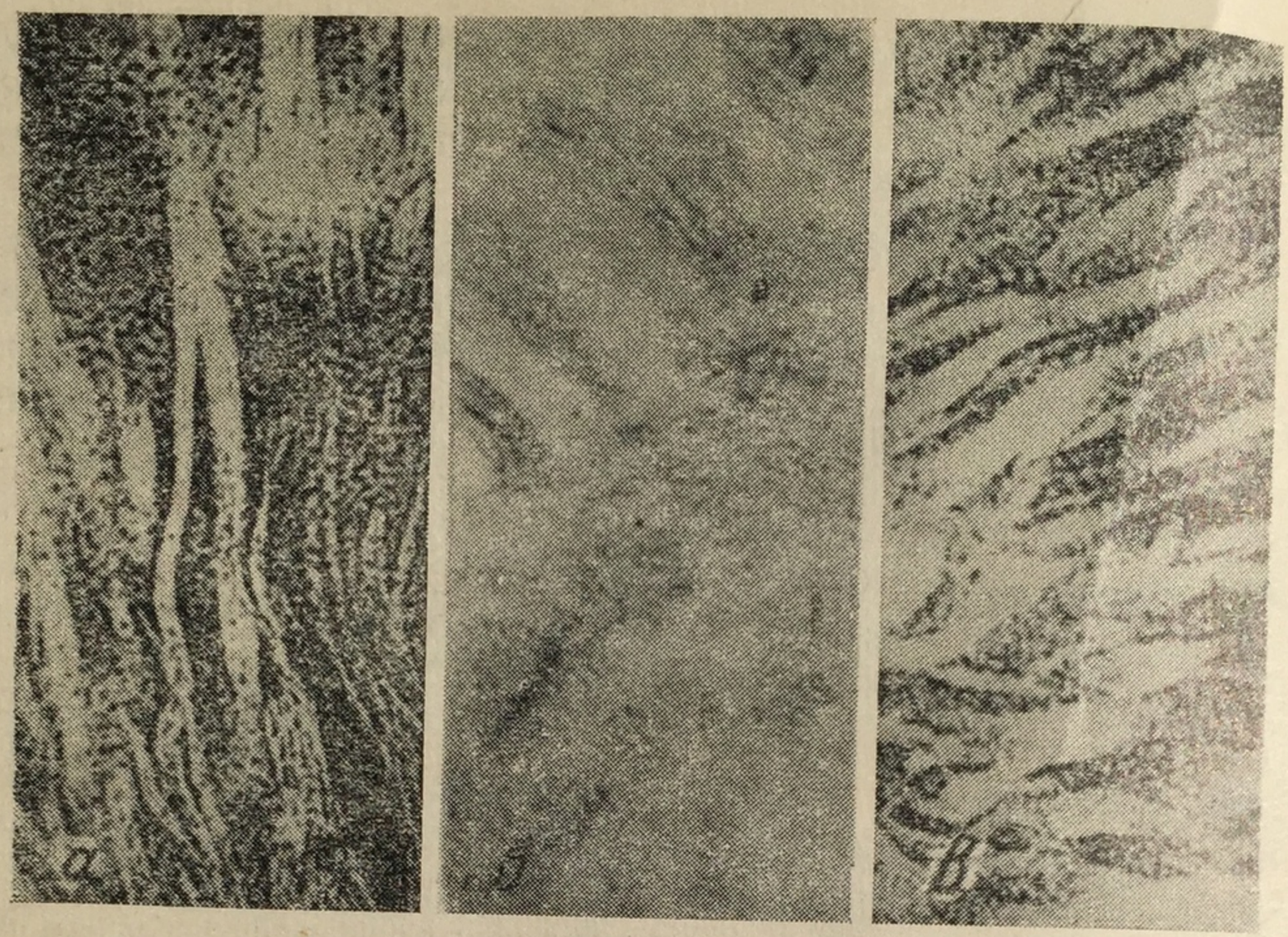


Рис. 30. Степень торможения холинэстеразы в мозгу мыши при отравлении эзерином и прозерином в дозах $ДЛ_{50}$.

а — контроль (декапитация неотравленной мыши); *б* — отравление эзерином: холинэстераза сильно угнетена (интенсивность окраски гораздо менее выражена, чем в контроле), *в* — отравление прозерином: холинэстераза незначительно угнетена (интенсивность окраски несколько менее выражена по сравнению с контролем). Ок. 5, об. 8. Фотографирование произведено при одинаковых условиях.

Это различие в действии эзерина и прозерина на активность холинэстеразы центральной нервной системы и мышечной ткани может быть объяснено тем, что эзерин, содержащий трехвалентный азот, хорошо проникает внутрь нервных клеток, в то время как прозерин, содержащий в своей молекуле четырехвалентный азот, действует только экстрацеллюлярно (Schweitzer и др., 1939).

Опыты с бутирилтиохолином, гидролизуемым избирательно ложной холинэстеразой, не дали четких результатов. Это, по-видимому, связано с тем, что при выявлении только ложной, неспецифической, холинэстеразы указанным методом даже в контрольных опытах (без ингибиторов) получается лишь слабое диффузное окрашивание среза, которое трудно поддается сравнительной оценке.

В некоторых опытах мы попытались применить предварительную обработку кусочков ткани ацетоном на холоду по методу Португалова и Яковлева (1951). Однако

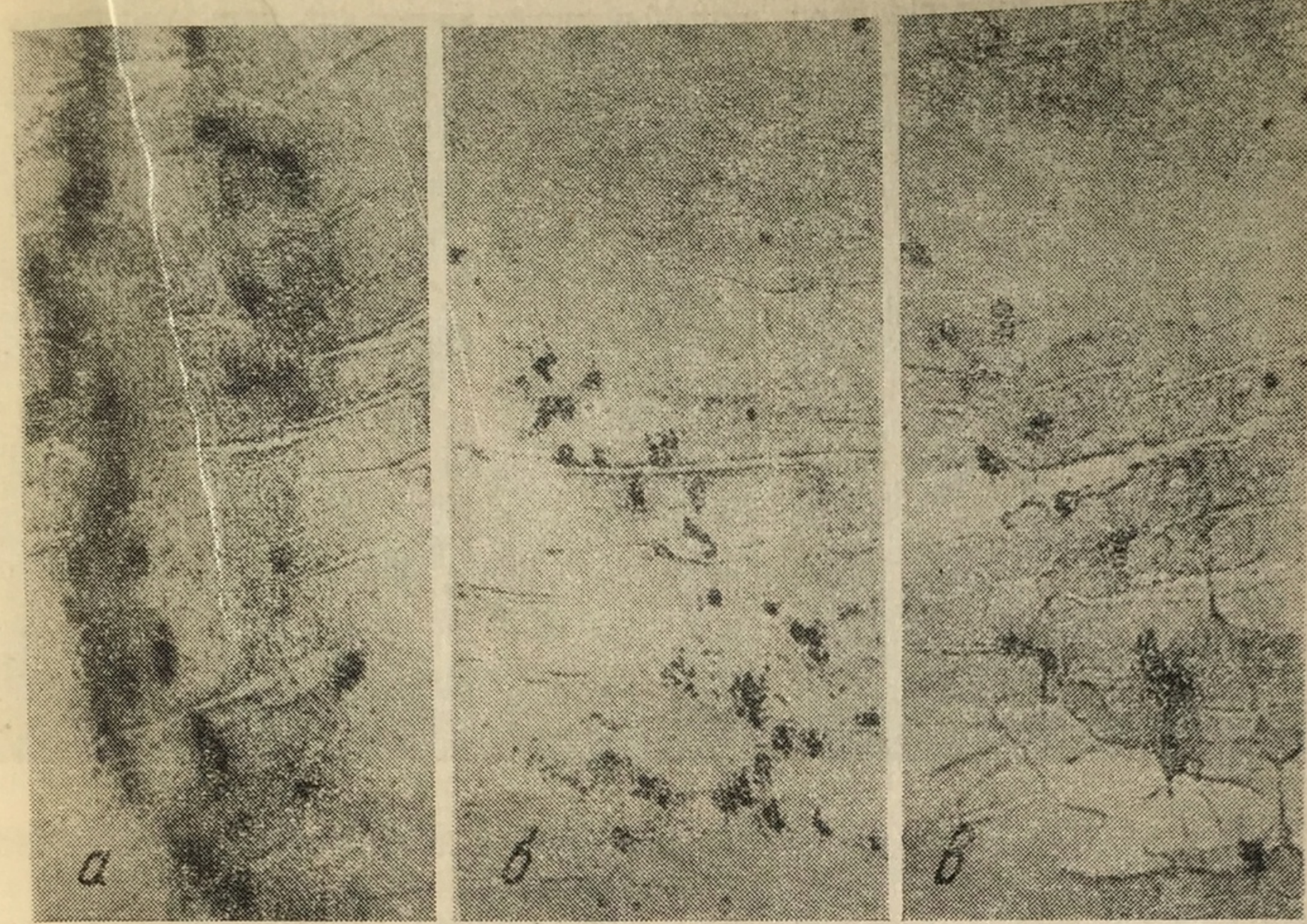


Рис. 31. Степень торможения холинэстеразы в мышцах мыши при отравлении эзерином и прозерином в дозах $ДЛ_{50}$.

а — контроль (декапитация неотравленной мыши); *б* — отравление эзерином: холинэстераза сильно угнетена; *в* — отравление прозерином: холинэстераза сильно угнетена. Ок. 5, об. 8. Фотографирование произведено при одинаковых условиях.

обработка ацетоном не улучшила в наших опытах выявления ни истинной, ни ложной холинэстеразы.

Для того чтобы выявить, как прозерин угнетает гидролиз ацетилтиохолина срезами тканей in vitro, была поставлена специальная серия опытов. Срезы мышечной ткани помещали в раствор прозерина в концентрации $1 \cdot 10^{-10}$ — $1 \cdot 10^{-3}$ с экспозицией 30 минут с последующей инкубацией в ацетилтиохолине в течение часа.

Опыты показали, что, как правило, прозерин в концентрациях от $1 \cdot 10^{-3}$ до $1 \cdot 10^{-6}$ при экспозиции 30 минут полностью задерживает выявление моторных бляшек мышечной ткани ацетилтиохолином. Ткань имеет бледно-желтый цвет со слабо выраженной границей мышечных волокон. Моторные бляшки в виде сероватых теней становятся видимыми лишь при снижении концентрации прозерина до $1 \cdot 10^{-7}$. С дальнейшим уменьшением концентрации прозерина бляшки становятся хорошо различимыми, окрашиваются в темно-коричневый цвет, с четко

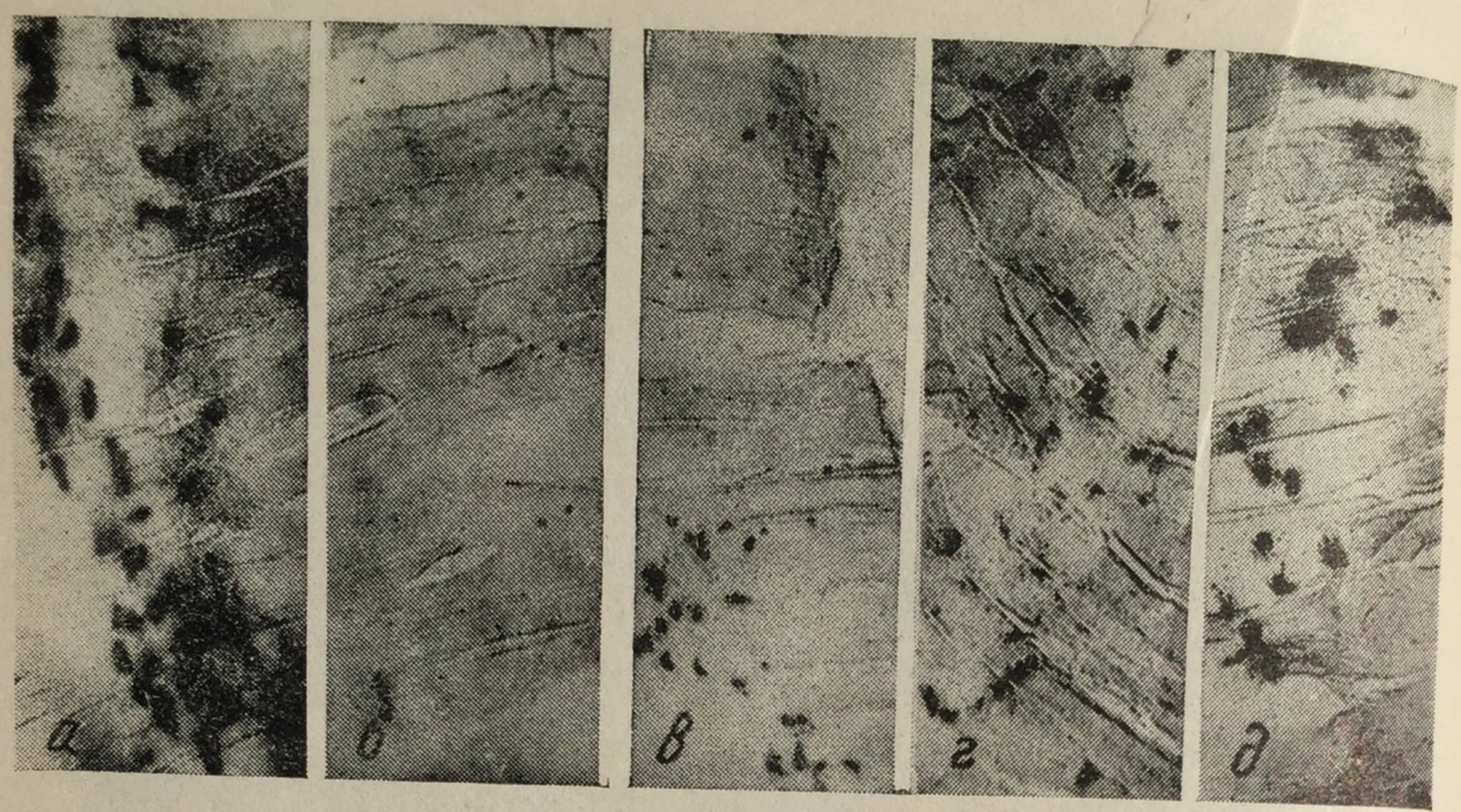


Рис. 32. Действие прозерина на активность холинэстеразы мышечной ткани.

а — контроль (ткань предварительно не обрабатывалась прозерином); *б* — действие прозерина в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$: полное угнетение активности холинэстеразы (моторные бляшки не выявляются); *в* — действие прозерина в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$: выявление следов активности холинэстеразы; *г* — действие прозерина в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$: активность холинэстеразы лучше выявляется, чем в предыдущем случае; *д* — действие прозерина в концентрации $1 \cdot 10^{-10}$: активность холинэстеразы выявляется так же хорошо, как и в контроле. Ок. 5, об. 8. Фотографирование произведено при одинаковых условиях.

выраженными контурами, в особенности при концентрации не более $1 \cdot 10^{-9}$—$1 \cdot 10^{-10}$ (рис. 32).

Таким образом, наши опыты показали, что гистохимический метод позволяет выявить резкие различия в интенсивности окраски на истинную холинэстеразу в срезах тканей животных, отравленных эзерином и прозерином, и в срезах тканей контрольных животных.

Вместе с тем гистохимический метод не является количественным. Он не позволяет определить, насколько угнетена холинэстераза. Поэтому мы предприняли в дальнейшем попытку более прямого определения степени угнетения холинэстеразы в тканях при отравлении прозерином. Эти опыты будут изложены ниже.

Отравление тетраэтилсвинцом. Широкое применение тетраэтилсвинца в народном хозяйстве и его ядовитые качества давно уже привлекли внимание судебных медиков.

Тетраэтилсвинец $Pb(C_2H_5)_4$, или сокращенно ТЭС, представляет собой бесцветную маслянистую жидкость

с приторно-фруктовым запахом и таким же вкусом. Точка кипения 200°. Удельный вес 1,65 при 20°. В воде ТЭС почти нерастворим, но легко растворяется в керосине, бензине, эфире, алкоголе, жирах и липоидах. Легко воспламеняется и горит голубоватым пламенем.

Тетраэтилсвинец начал широко применяться с 1921 г., когда были открыты его антидетонационные свойства. В настоящее время к моторному топливу — бензину и керосину — в качестве антидетонатора прибавляют не чистый ТЭС, а так называемую свинцовую (этиловую) жидкость. Этиловая жидкость содержит от 50 до 60% чистого ТЭС.

Отравления тетраэтилсвинцом встречаются при различных обстоятельствах. Как правило, отравления очень часто связаны с нарушением инструкций по хранению, транспортировке или использованию этилированного бензина, этиловой жидкости или самого ТЭС. Нередко встречаются отравления тетраэтилсвинцом при употреблении его в качестве суррогата алкоголя. Все эти обстоятельства придают ТЭС большое судебно-медицинское значение.

Тетраэтилсвинец является сильнейшим нервно-сосудистым ядом, поражающим преимущественно центральную нервную систему, в особенности функции коры головного мозга. Наблюдающиеся у отравленных симптомы психического возбуждения заслужили тетраэтилсвинцу название «сумасшедшего яда». Отравления возможны при поступлении в организм тетраэтилсвинца или содержащих его этиловой жидкости или этилированного бензина через дыхательные пути (пары), неповрежденную кожу и рот (Н. В. Лазарев, 1951).

Действие ТЭС проявляется не сразу, а после известного скрытого периода (от нескольких часов до 2—3 суток, а при хронических отравлениях — до нескольких недель). Токсичность тетраэтилсвинца очень высокая. Отмечено отравление от его паров, содержание которых в воздухе жилого помещения составляло всего 0,0015 мг/л. Предельно допустимой концентрацией паров ТЭС в воздухе рабочих помещений считается 0,000003 мг/л.

Имеются многочисленные экспериментальные работы по определению токсичности ТЭС и этиловой жидкости для животных при ингаляции и накожной аппликации. Вдыхание паров ТЭС в течение 15 минут в концентрации 4—5 мг/л вызывает смерть кошек и собак. Смертельная

концентрация этиловой жидкости при этих условиях равняется 8 мг/л. Минимальные дозы жидкого ТЭС, ведущие к смерти при накожной аппликации, равняются 0,1 мл/кг, а этиловой жидкости —0,6—0,9 мл/кг. Смерть наступает в течение 3 суток. Для собак эта доза составляет 0,3 мг/кг. Смертельная доза ТЭС для человека не установлена, но, по-видимому, она находится в пределах немногих граммов.

Отравления тетраэтилсвинцом подразделяются на острые, подострые и хронические формы.

По наблюдениям П. Н. Сафронова и Я. Р. Савинского (1958), острая форма отравления развивается при одномоментном проникновении в организм сравнительно массивных количеств яда и характеризуется бурным течением с преобладанием нарушений со стороны коры головного мозга. Случаи острого отравления протекают по типу экзогенного психоза, сопровождающегося явлениями психомоторного возбуждения. На фоне выраженных вегетативных расстройств (брадикардии, гипотонии, гипотермии) быстро нарастают психопатологические явления: слуховые, зрительные, тактильные и обонятельные галлюцинации, бред преследования, упорная бессонница. Часто это сопровождается буйством и агрессивностью поведения. Иногда эти отравления протекают с органическим симптомокомплексом: атаксической походкой, дизартрией, гипомимией, скованностью. Состояние бурно протекающего экзогенного психоза наблюдается на протяжении всего заболевания. В тяжелых случаях наступает кома с последующим смертельным исходом. Смерть наступает чаще всего на 2—3-и сутки.

Подострая форма отравления протекает с преобладанием расстройств вегетативного характера. Брадикардия, гипотония и гипотермия значительно сильнее выражены, чем при острой форме. Появляются слюнотечение, гипергидроз, акроцианоз, различного рода парестезии. Во рту возникает ощущение волос, ниток. Часто наблюдаются тремор пальцев, языка и век, а также подергивание различных мышц. Симптомы поражения коры головного мозга выражены отчетливо, но значительно слабее, чем при острой форме отравления. Психомоторное возбуждение и делириозное состояние протекают волнообразно — кратковременные улучшения сменяются вновь картиной экзогенного психоза. Нередко развива-

ются явления нервнотрофических расстройств: выпадение волос на голове, появление на лице, губах, коже тела различного рода трещин, гнойничков, кровоподтеков, петехий, геморрагической сыпи, язв. Со стороны крови наблюдаются лейкоцитоз до 12 000—15 000, ускорение РОЭ. Количество гемоглобина и эритроцитов снижено. В моче обнаруживается свинец. Заболевание продолжается 2—3 недели и кончается часто выздоровлением.

Хроническая форма отравления характеризуется преимущественно развитием вегетативно-астенического синдрома и возникает в результате длительного воздействия малых концентраций ТЭС, этиловой жидкости или этилированного бензина. Эта форма отравления развивается очень незаметно, медленно растягиваясь на многие месяцы. Постепенно появляются общая слабость, повышенная утомляемость, головокружение, головные боли, плохой аппетит, металлический вкус во рту. Все это сопровождается вегетативными расстройствами: повышенной потливостью, саливацией, дрожанием век, кончика языка и пальцев вытянутых рук, выраженным дермографизмом. Брадикардия, гипотония и гипотермия бывают отчетливо выражены. Пульс становится редким (45—50 ударов в минуту), температура тела падает до 35—35,5°, артериальное давление снижается до 80 мм рт. ст. Позднее присоединяются симптомы, характерные для пределириозного состояния. Сон становится тревожным и сопровождается устрашающими галлюцинациями. Появляются обманы чувств и восприятий, но галлюцинации не достигают большой степени. Со стороны крови наблюдаются лейкопения, моноцитоз, гипохромная анемия, безофильная зернистость эритроцитов. Характерным симптомом этой формы отравления является значительное исхудание. В моче определяются свинец и гематопорфирин. При неврологическом исследовании обнаруживают повышенную возбудимость мышц, полимоторные реакции, равномерное повышение сухожильных рефлексов, вялость мимики, гиперкинезы, фибриллярные подергивания, атаксию. Процесс выздоровления тяжелой степени хронического отравления наступает медленно и даже при энергичном лечении может затягиваться до 2—3 месяцев.

На вскрытии характерных изменений нет. Иногда патологоанатомические изменения проявляются в виде оте-

ка мозговых оболочек, вещества мозга, множественных геморрагий в мозгу и во внутренних органах, особенно в легких, а также частых пневмоний. В общей картине поражения мозга обращают на себя внимание острое набухание нервных клеток, явления тигролиза и кариоцитолиза, обнаруживается липоидная дистрофия, выраженная в различных структурных элементах мозга (Л. П. Петров, 1959).

В литературе приводится большое количество наблюдений над отравленными тетраэтилсвинцом, имеется довольно обширный экспериментальный материал. И несмотря на это, вопрос о механизме действия тетраэтилсвинца окончательно еще не выяснен. Опубликовано немало работ, посвященных исследованию вопроса о более точной анатомической локализации действия тетраэтилсвинца.

Однако все они основаны только на изучении морфологических изменений тканей и, как справедливо отмечает В. М. Рожков (1949), фиксируют перед исследователем лишь результат действия яда, не позволяя проникнуть в динамическую сущность этого действия. Накопился большой материал о морфологических изменениях при отравлении тетраэтилсвинцом. Независимо от форм проявления отравления (острые и хронические) тетраэтилсвинец всегда вызывает наиболее глубокие изменения со стороны центральной нервной системы. Эта избирательность локализации тетраэтилсвинца объясняется В. В. Андреевым (1933) липоидотропностью тетраэтилсвинца, что нашло подтверждение в исследованиях других авторов.

В 1946 г. Е. И. Веллинг и А. А. Преображенская установили увеличение содержания ацетилхолина в тканях при отравлении тетраэтилсвинцом. В. М. Рожков (1949) высказал предположение, что торможение холинэстеразы и стабилизации ацетилхолина при отравлении тетраэтилсвинцом может объяснить многие симптомы возбуждения холинергических систем, в частности повышения тонуса парасимпатической системы, которые характерны для этой интоксикации.

В 1948 г. Б. Я. Ришан и А. Н. Шогам обнаружили у 75% отравленных тетраэтилсвинцом угнетение холинэстеразы крови. П. К. Антонюк (1951) биологическим методом на изолированном сердце лягушки по Штраубе

отметил сильное угнетение холинэстеразы, достигавшее 60% от исходного в первые часы отравления.

Все эти факты побудили нас исследовать активность холинэстеразы в тканях животных, отравленных ТЭС, и выяснить возможность использования этого признака в целях судебно-медицинской диагностики. Опыты (Я. С. Смусин, 1955, 1957) были проведены на белых мышах. Тетраэтилсвинец вводили подкожно.

В литературе мы не нашли точных сведений о средней смертельной дозе тетраэтилсвинца для мышей при подкожном введении. Поэтому в ориентировочных опытах мы определили среднюю смертельную дозу, вызывавшую смерть в течение первых суток при подкожном введении тетраэтилсвинца у 50% мышей. Эта доза оказалась равной 1,07 г/кг.

После затравки тетраэтилсвинцом мышей забивали путем декапитации через разные промежутки времени с момента затравки: 1, 2, 4, 8, 12, 24 часа. Гистохимическому исследованию подвергали кусочки коры головного мозга, продолговатого мозга и икроножной мышцы. Исследовали активность как истинной, так и ложной холинэстеразы. Для выявления локализации истинной холинэстеразы ткань обрабатывали ацетилтиохолиниодидом, а для выявления ложной — бутирилтиохолинбромидом. Опыты показали, что при отравлении тетраэтилсвинцом отмечалось сильное угнетение истинной холинэстеразы: интенсивность окраски при обработке тканей ацетилтиохолиниодидом резко снижалась. Это явление наблюдалось как в коре головного мозга, так и в продолговатом мозгу и в икроножной мышце, причем четкая картина угнетения истинной холинэстеразы выявлялась уже через час после введения яда (рис. 33). Наибольшая степень угнетения холинэстеразы наблюдалась в большинстве случаев у мышей, забитых через 4—8 часов после отравления. При этом степень угнетения холинэстеразы была приблизительно одинакова как в коре головного мозга, так и в продолговатом мозгу и мышечной ткани. Предварительная обработка тканей ацетоном (по методу Португалова и Яковлева) при отравлении тетраэтилсвинцом не оказывала заметного влияния на интенсивность окраски среза по сравнению с тканями, не обработанными ацетоном. Это может служить указанием на то, что тетраэтилсвинец хорошо проникает во все тканевые

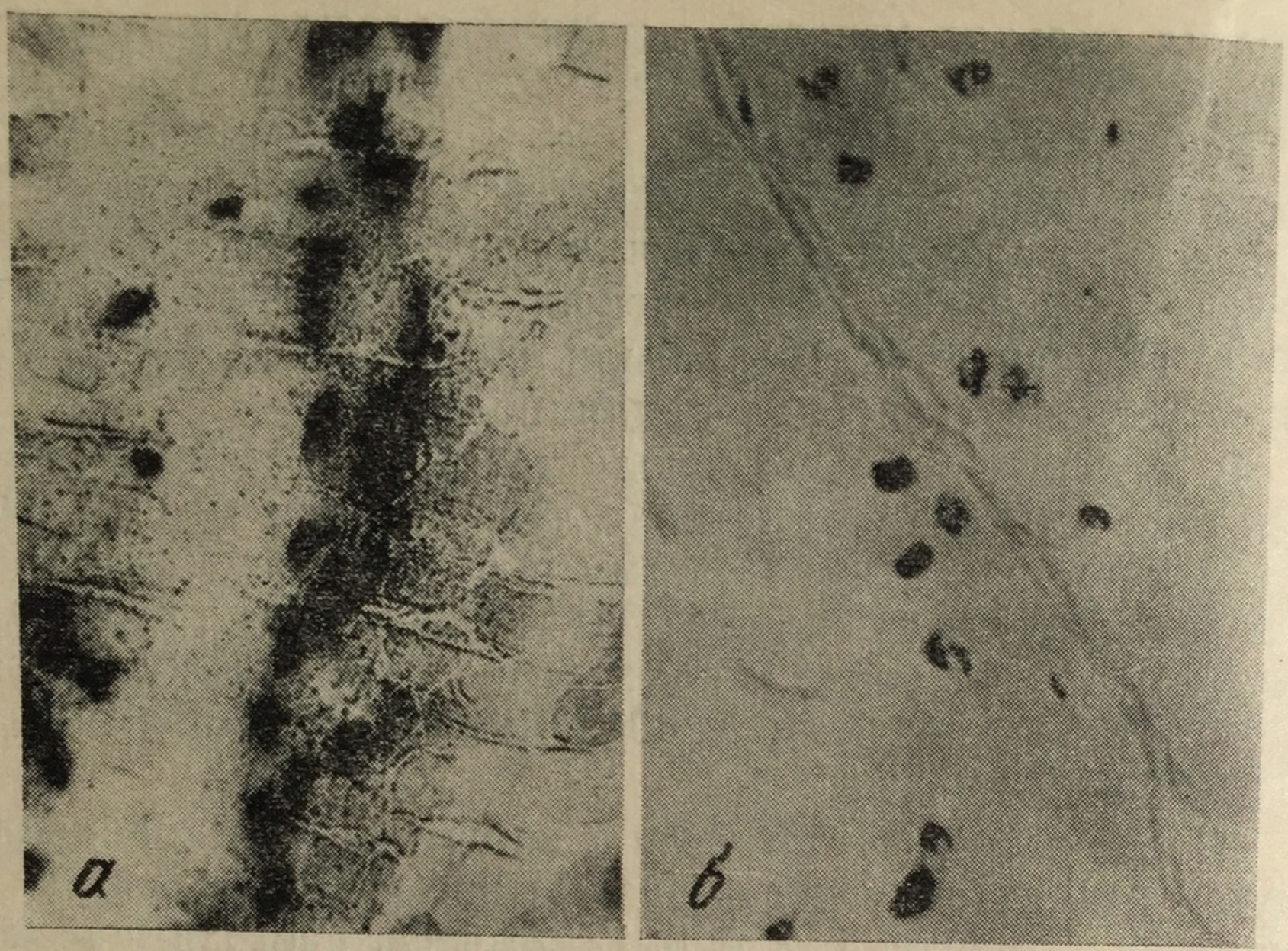


Рис. 33. Отравление тетраэтилсвинцом. Белая мышь, икроножная мышца.

а — контроль (декапитация неотравленной мыши); *б* — декапитация через час после введения тетраэтилсвинца: холинэстераза значительно угнетена (интенсивность окраски гораздо менее выражена, чем в контроле). Ок. 5, об. 8. Фотографирование произведено при одинаковых условиях.

структуры, в том числе и липоидные, и угнетает холинэстеразу в упомянутых структурах.

Опыты с применением бутирилтиохолина, который гидролизуется избирательно ложной холинэстеразой, не дали четких результатов. Видимо, это связано с тем, что при выявлении только ложной холинэстеразы с применением указанного субстрата даже в контрольных опытах (без ингибитора) получается слабое диффузное окрашивание, трудно поддающееся сравнительной оценке.

В клинической картине отравления тетраэтилсвинцом ряд симптомов свидетельствует о повышении тонуса парасимпатического отдела вегетативной нервной системы: брадикардия, доходящая до 40—35 ударов в минуту, понижение кровяного давления до 80/40 мм рт. ст., потливость, слюнотечение, а также стойкий белый дермографизм. Длительный пиломоторный рефлекс может служить указанием на возбуждение холинергических волокон симпатических нервов, идущих к потовым железам.

Симптомы отравления, характеризующие состояние центральной нервной системы и в особенности высшей нервной деятельности, тоже могут быть поняты как результат возбуждения холинергических структур центральной нервной системы. Важная физиологическая роль ацетилхолина в функции коры головного мозга была показана в работе М. А. Михельсона, Е. К. Рожковой и Н. А. Саватеева (1954) и другими исследователями.

Тот факт, что холинолитические препараты (пентафен) могут предупредить нарушение высшей нервной деятельности тетраэтилсвинцом (Л. М. Григорьева, 1953) и даже излечить смертельные отравления тетраэтисвинцом (Л. М. Григорьева и В. П. Парибок, 1953), служит указанием на то, что в механизме центрального действия тетраэтилсвинца важное значение имеет возбуждение холинергических систем мозга.

Возбуждение холинергических систем может явиться следствием торможения холинэстеразы. На способность тетраэтилсвинца тормозить холинэстеразу крови уже имелись некоторые указания в клинической и токсикологической литературе (Б. Я. Ришан и А. Н. Шогам и П. К. Антонюк).

Наши исследования показали, что при отравлении тетраэтилсвинцом в эксперименте наблюдается сильно выраженное торможение истинной холинэстеразы коры головного мозга, продолговатого мозга, а также мышечной ткани. Эти данные позволяют предположить, что антихолинэстеразное действие тетраэтилсвинца играет роль и в развитии тех центральных, в частности корковых, симптомов, которые характерны для отравления. Кроме того, тетраэтилсвинец наряду со способностью тормозить холинэстеразу обладает и непосредственным холиноподобным возбуждающим действием на холинореактивные системы головного мозга. Однако это подлежит дальнейшей экспериментальной проверке. Во всяком случае, представляется вероятным, что в механизме токсического действия тетраэтилсвинца важную роль играет возбуждение холинергических систем мозга.

Вопрос о соотношении прямого влияния тетраэтилсвинца на холинергические системы мозга и других возможных механизмов его действия, на которые есть указания в литературе, подлежит дальнейшей разработке. Независимо от того, какое значение антихолинэсте-

разное действие ТЭС имеет в механизме токсического действия этого вещества, сам факт выраженного торможения холинэстеразы при отравлении может быть использован как дополнительный показатель при судебно-медицинской диагностике.

Отравления наркотиками. В литературе накопилось значительное количество работ, посвященных действию наркотиков на холинэстеразу. Подробный разбор этой литературе приведен в монографии М. Я. Михельсона (1948). В той же монографии приведены и собственные данные М. Я. Михельсона по этому вопросу.

Показано, что наркотики вызывают значительное (50% и выше) торможение активности холинэстераз уже в тех концентрациях, в которых они находятся в крови и в мозгу во время наркоза. Вопрос, играет ли это торможение холинэстераз наркотиками значительную роль в механизме самого наркотического эффекта, еще не решен окончательно. Тем не менее, поскольку при наркотических (а тем более при смертельных) дозах всех наркотиков обнаружено значительное торможение холинэстераз, постольку этот признак может быть использован в судебно-медицинской практике.

Основная трудность в случае отравления наркотиками опять-таки состоит в том, что торможение холинэстераз наркотиками очень легко обратимо (гораздо легче, чем даже торможение эзерином и прозерином). Поэтому обычные методы, связанные с разведением тканей, не позволяют уловить то торможение, которое отмечалось в неразведенной ткани. Учитывая эти методические трудности, мы начали определение активности холинэстераз при отравлении наркотиками с гистохимического метода.

Наши опыты (Я. С. Смусин, 1956, 1957) проводились на белых мышах. Было исследовано действие на холинэстеразу 9 хирургических наркотиков — представителей разных химических групп: эфир, хлороформ, мединал, гексенал, барбамил, уретан, хлоралгидрат, тимол, сульфат магния. Эфир и хлороформ вводили ингаляционно, остальные — подкожно. Действие наркотиков на холинэстеразу изучали в зависимости от их доз: использовали наркотические и смертельные дозы. Подбирали такие наркотические дозы, которые вызывали глубокий хирургический наркоз, при котором мыши не реагировали на

сильное пощипывание хвоста. На высоте наркоза мышей забивали путем декапитации. При введении мединала декапитация производилась на высоте глубокого сна животного. При введении тимола не удалось получить настоящего глубокого наркоза в условиях нашей методики, но животные принимали боковое положение. В качестве смертельных доз вводили такие минимальные дозы, от которых наступала гибель животных в пределах от нескольких минут до нескольких часов после введения наркотика.

Гистохимическим методом определялась активность холинэстеразы в коре головного мозга, в продолговатом мозгу и в икроножной мышце. Параллельно с этим в ряде случаев активность холинэстеразы исследовали после предварительной обработки кусочков тканей в ацетоне на холоду. Для выявления истинной холинэстеразы исследуемую ткань обрабатывали ацетилтиохолином, а для выявления ложной — бутирилтиохолином. В качестве контроля служила гистохимическая картина при определении истинной и ложной холинэстеразы интактных мышей, забитых декапитацией.

Результаты опытов, касающихся изменений активности истинной холинэстеразы коры головного мозга, продолговатого мозга и мышечной ткани без предварительной обработки тканей ацетоном, приводятся в табл. 26.

Из табл. 26 видно, что все наркотики, исключая сульфат магния, уже в наркотических дозах угнетают активность истинной холинэстеразы в среднем приблизительно на одну треть по сравнению с контролем. Еще бóльшая степень угнетения истинной холинэстеразы отмечается при смертельных дозах — активность холинэстеразы угнетается почти наполовину. Если сравнить силу угнетающего действия различных наркотиков, то оказывается, что они действуют приблизательно одинаково. При этом степень угнетения холинэстеразы коры головного мозга и продолговатого мозга почти одинакова. Угнетение в мышечной ткани либо такое же, либо выражено несколько слабее (рис. 34). При отравлении наркотиками не отмечалось существенной разницы в степени выявления фермента в тканях в зависимости от их предварительной обработки ацетоном.

Что же касается степени выявления ложной холинэстеразы, то при обработке контрольных срезов бутирил-

Таблица 26

Изменение активности холинэстеразы белых мышей при отравлении наркотиками

№ п/п	Наркотики	Доза (в г/кг)	Кора	Продолговатый мозг	Мышца
1	Контроль (декапитация)		+ + + +	+ + + +	+ + + +
2	Эфир—наркоз		+ + +	+ + +	+ + +
3	Эфир—смерть		+ +	+ +	+ +
4	Хлороформ—наркоз		+ +	+ +	+ + +
5	Хлороформ—смерть		+	+ +	+ +
6	Мединал—наркоз	0,8	+ + +	+ +	+
7	Мединал—смерть	0,9	+ +	+ +	+
8	Гексенал—наркоз	0,3	+ + +	+ +	+ + +
9	Гексенал—смерть	0,5	+ +	+ +	+ +
10	Барбамил—наркоз	0,3	+ +	+ +	+ +
11	Барбамил—смерть	0,4	+ +	+ +	+ +
12	Уретан—наркоз	1,5	+ + +	+ +	+ + +
13	Уретан—смерть	2,0	+ +	+ +	+ +
14	Хлоралгидрат—наркоз	0,7	+ + +	+ + +	+ + +
15	Хлоралгидрат—смерть	1,1	+ +	+ +	+ + +
16	Тимол—смерть	4,0	+ +	+ +	+ + +
17	Сульфат магния—наркоз	1,7	+ + + +	+ + + +	+ + + +
18	Сульфат магния—смерть	2,0	+ + + +	+ + + +	+ + + +

Примечание. + + + + степень выявления холинэстеразы такая же, как в контрольных опытах;

+ + + выявленне холинэстеразы несколько уменьшено по сравнению с контролем;

+ + выявление холинэстеразы значительно уменьшено по сравнению с контролем;

+ следы холинэстеразы;

тиохолином вся ткань диффузно окрашивается в бледно-желтый цвет. Это не дает возможности выявить каких-либо изменений при отравлении наркотиками.

Основной результат наших опытов состоит в том, что при действии 8 различных наркотиков (эфир, хлороформ, мединал, гексенал, барбамил, уретан, хлоралгидрат, тимол) в наркотических дозах мы наблюдали отчетливое торможение холинэстеразы в мозгу и в других тканях. Этот факт, полученный гистохимическим методом, подтверждает литературные данные, что во время наркоза имеется значительное торможение активности холинэстеразы в тканях, в частности в мозгу.

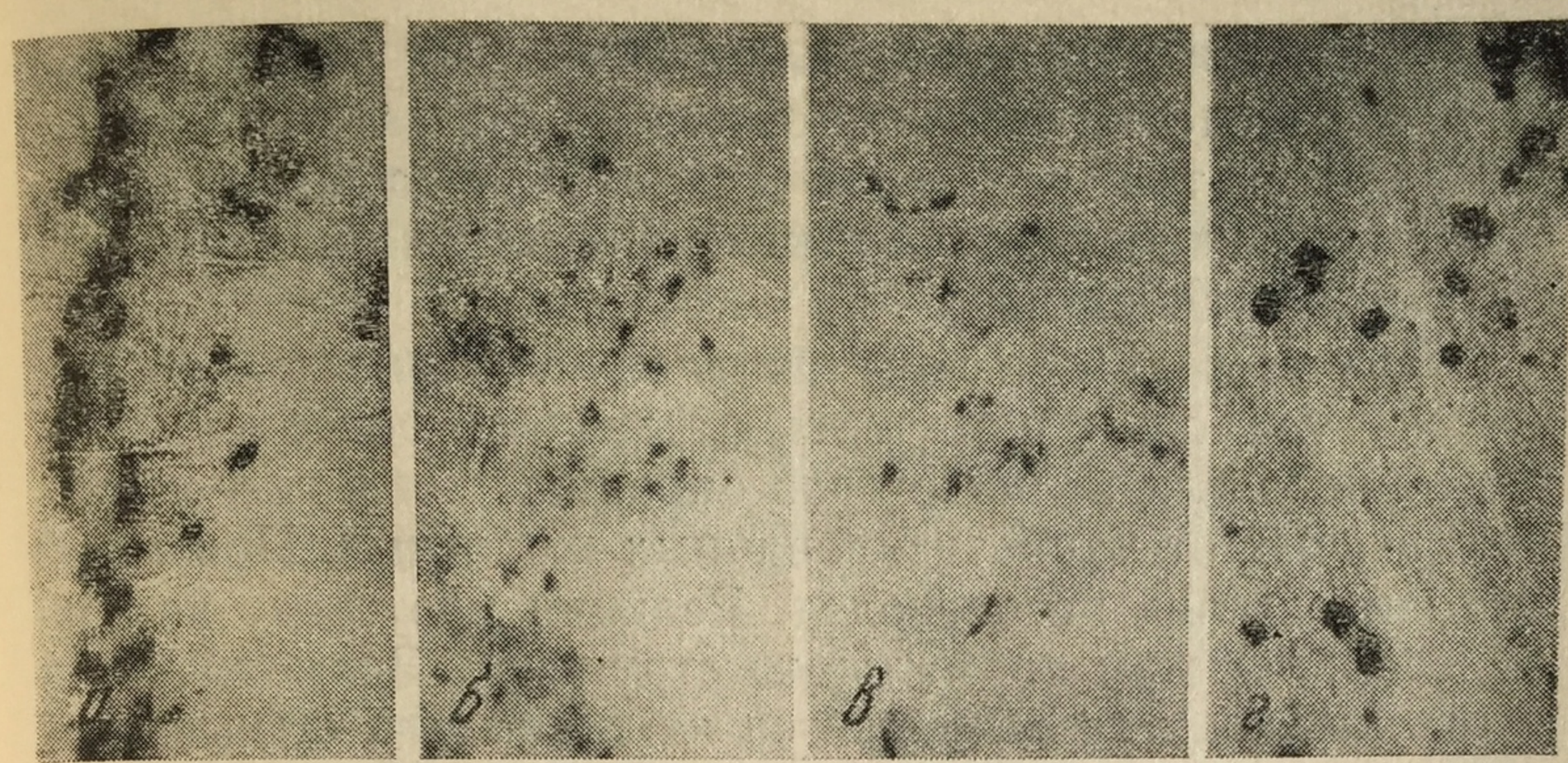


Рис. 34. Отравление наркотиками. Икроножная мышца белых мышей.

а — контроль (декапитация); *б* — отравление эфиром: сильное угнетение активности холинэстеразы (интенсивность окраски менее выражена, чем в контроле); *в* — отравление мединалом: сильное угнетение активности холинэстеразы; *г* — отравление сульфатом магния: холинэстераза не угнетена (интенсивность окраски такая же, как и в контроле). Ок. 5, об. 8. Фотографирование произведено при одинаковых условиях.

При магнезиальном наркозе никакого торможения активности холинэстеразы мы не наблюдали. Это хорошо согласуется с представлением, что магнезиальный наркоз имеет совсем другой механизм по сравнению с действием наркотиков жирного ряда. Магнезиальный наркоз, по-видимому, зависит в основном от способностей солей магния блокировать холинорецепторы в центральной нервной системе и отчасти затруднять выделение ацетилхолина (см. обзоры Feldberg, 1954, 1957). Есть также указания на то, что сернокислый магний уменьшает выделение ацетилхолина в холинергических синапсах. В пользу такого представления свидетельствует, между прочим, и возможность снятия магнезиального наркоза с помощью эзерина (М. П. Николаев, 1941).

Не занимаясь специально изучением вопроса о природе наркоза, отметим лишь, что полученный рядом исследователей (в особенности М. Я. Михельсоном) факт угнетения активности холинэстеразы при действии наркотиков in vitro и подтвержденный нами гистохимическим методом исследования может оказать существенную помощь при судебно-медицинской диагностике смертельных отравлений людей наркотиками, которые нередко встречаются в судебно-медицинской практике.

Отравление этиловым алкоголем. Как уже упоминалось, определение степени торможения активности холинэстеразы в той или иной ткани in vivo представляет большие трудности, если угнетение вызвано ингибитором обратимого действия.

При гистохимическом выявлении холинэстеразы нам все же удалось обнаружить отчетливое ослабление характерного для холинэстераз окрашивания в срезах тканей, взятых от наркотизированных животных. При такой методике ткань не разводят. Реакция протекает на срезе, сохраняющем нормальную структуру. Возможно, при этом наркотик не вымывается из ткани или вымывается очень медленно, и его тормозящее действие на холинэстеразы может быть выявлено. Отсюда возникло предположение, что действие обратимых ингибиторов, в частности наркотиков, на холинэстеразу можно обнаружить, если вырезать из наркотизированного животного кусочек ткани (мышцу, нерв, участок мозга) и, не растирая, поместить его в раствор ацетилхолина.

Наши опыты (Я. С. Смусин, 1962) проводились на 252 лягушках обоего пола. У лягушки вырезали обе прямые мышцы живота и после взвешивания помещали в стаканчик с 10 мл аэрируемого раствора ацетилхолина $1 \cdot 10^{-5}$, приготовленного на рингеровской жидкости, при температуре 20°. Постепенное снижение концентрации ацетилхолина в окружающей мышцы жидкости в результате его гидролиза определялось путем периодического тестирования небольших проб этой жидкости на препарате прямой мышцы живота другой лягушки. Определив время полураспада (T_{50}), можно высчитать коэффициент холинэстеразной активности (QChE) мышцы в миллиграммах ацетилхолина, гидролизуемых 1 г ткани в час. В этих условиях QChE оказывался всегда гораздо ниже, чем был бы при растирании ткани (А. Г. Гинецинский и З. И. Барбашова, 1949), потому что в интактном кусочке гидролиз идет только на поверхности. Однако при тех же условиях можно было сравнить ход разрушения ацетилхолина тканью, взятой от контрольного и от наркотизированного животного. Точно так же ставили опыты с интактными нервами: в каждом опыте использовали седалищные нервы от нескольких лягушек.

В других опытах для сравнения определялась в тех же условиях активность холинэстеразы предварительно

растертых мышц или нервов. Для иллюстрации методики приводим выписку из протокола одного контрольного опыта по определению коэффициента активности холинэстеразы прямой мышцы живота лягушки путем тестирования окружающего мышцу раствора на препарате другой мышцы лягушки.

Опыт № 381 20 апреля 1959 г.

Вес прямых мышц живота 3 лягушек-246 мг

Время прилива-ния (час, минута)	Что прили-вается	Длительность приливания (в минутах)	Высота сокраще-ния мышцы (в мм)	Длительность контакта раствора ацетилхолина с мышцей	Процент разру-шения	T_{50}	QChE
20—45	К $1 \cdot 10^{-6}$	2	69				
20—55	К $5 \cdot 10^{-7}$	2	60				
21—05	К $2 \cdot 5 \cdot 10^{-7}$	2	37				
21—15	1 $5 \cdot 10^{-7}$	2	38	120 мин.	50	120 мин.	0,100
21—25	К $5 \cdot 10^{-7}$	2	62				
21—35	К $2 \cdot 5 \cdot 10^{-7}$	2	39				

Примечание. Буквой К обозначены пробы, в которых к мышце — тест-объекту приливали свежий раствор ацетилхолина указанной концентрации. Проба 1 — концентрация ацетилхолина, находившегося на протяжении 120 минут в контакте с теми мышцами, холинэстеразная активность которых определялась в этом опыте.

С помощью графической интерполяции (рис. 35) определяем процент разрушения ацетилхолина, а затем вычисляем время полураспада (T_{50}), а по нему — коэффициент активности холинэстеразы QChE.

Расчет коэффициента активности холинэстеразы производим следующим образом. Время полураспада (T_{50}) активности холинэстеразы составляет 120 минут, т. е. за это время разрушилось 0,05 мг ацетилхолина (в 10 мл ацетилхолина в разведении $1 \cdot 10^{-5}$ содержится 0,1 мг ацетилхолина; за 120 минут, т. е. время полураспада, разрушится 0,05 мг ацетилхолина). За 1 час должно разрушиться X мг ацетилхолина. Следовательно,

$$X = \frac{60 \cdot 0{,}05}{120} = 0{,}025 \text{ мг.}$$

246 мг мышцы разрушили 0,025 мг ацетилхолина. 1000 мг мышцы должно разрушить X мг ацетилхолина, откуда

$$X=\frac{1000\cdot 0{,}025}{246}=0{,}100 \text{ мг.}$$

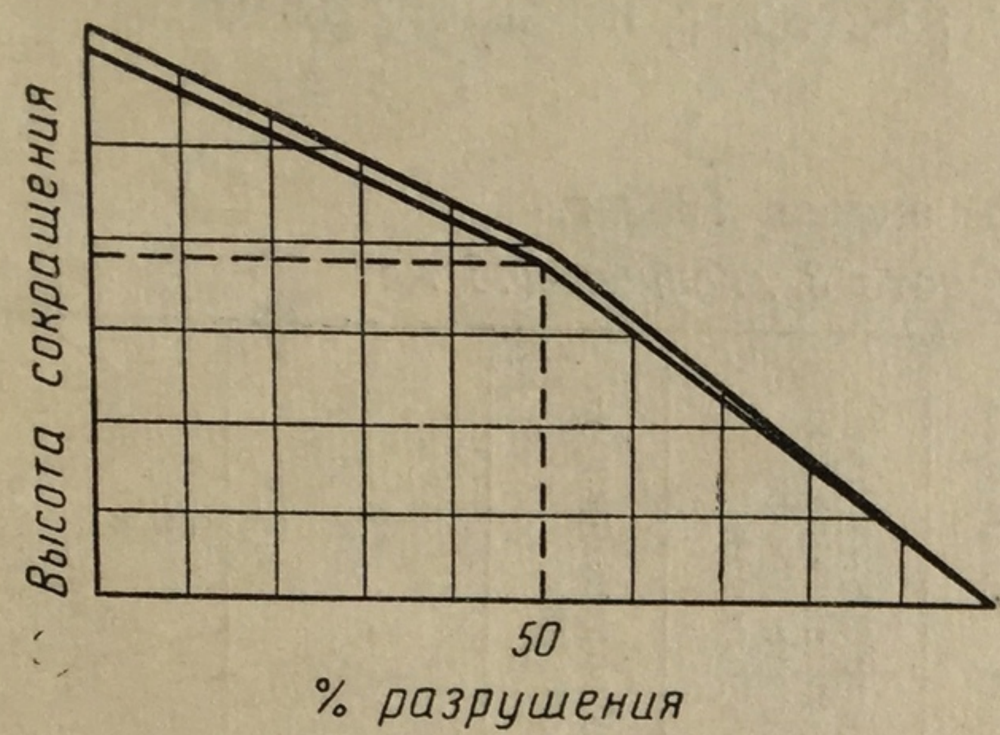


Рис. 35. Определение процента разрушения ацетилхолина (объяснение см. в тексте).

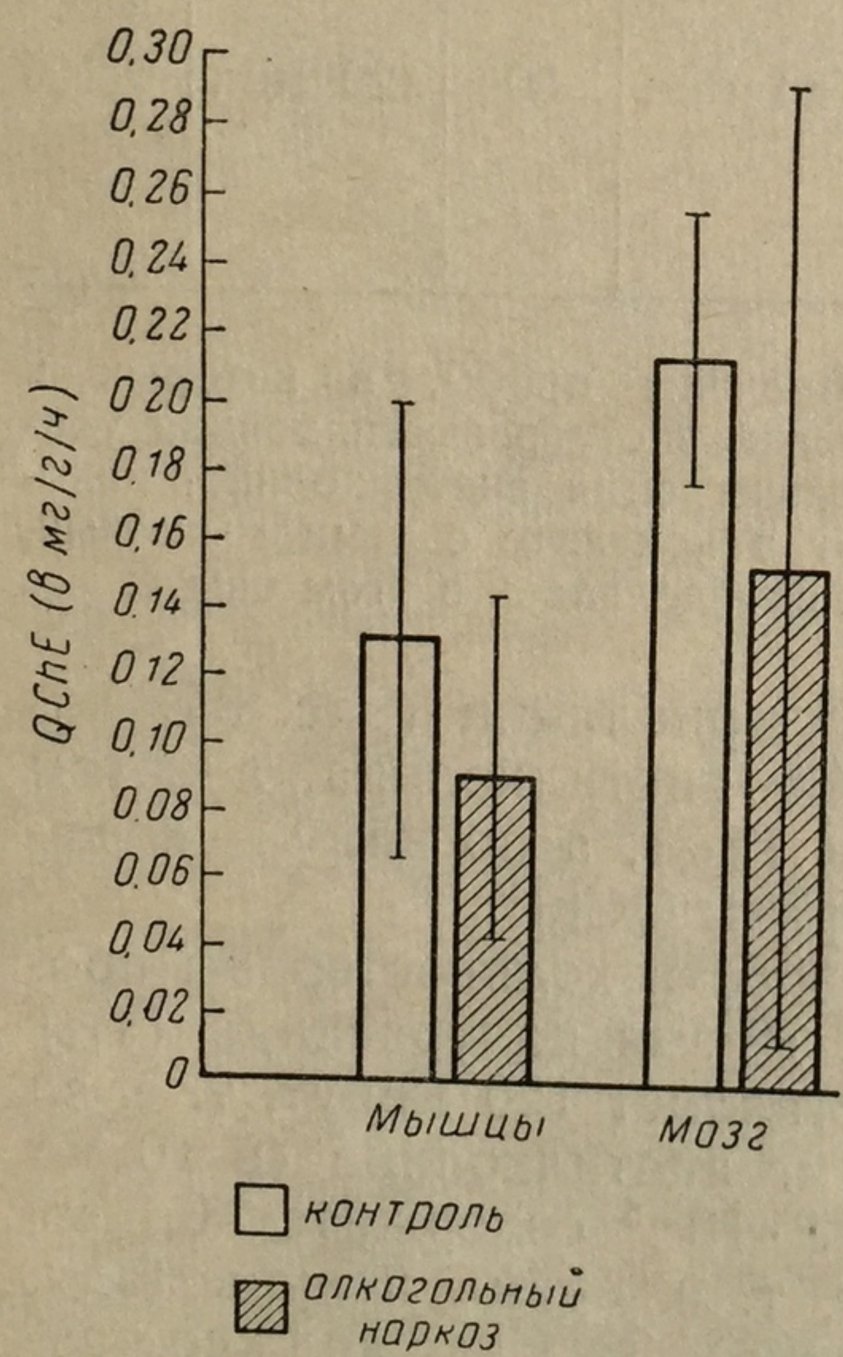


Рис. 36. Коэффициент активности холинэстеразы в норме и после алкогольного наркоза (объяснение см. в тексте).

Таким образом, в опыте № 381 коэффициент активности холинэстеразы прямых мышц живота лягушек составил 0,100 мг/г/час.

В первой серии опытов сравнивалась активность холинэстераз мышц и нервов контрольных лягушек с активностью мышц и нервов лягушек, находившихся в течение суток в алкогольном наркозе (в воде, содержащей 0,35 М/л этилового спирта). Результаты приведены в табл. 27 и на рис. 36.

Следовательно, при алкогольном наркозе наблюдается угнетение активности холинэстеразы мышц и нервов лягушек, определяемая методом «неразведенной ткани», на 30%.

Из табл. 27 видно, что в присутствии мышц и нервов, взятых от наркотизированных животных, гидролиз ацетилхолина происходил в 1,4 раза медленнее, чем в присутствии тканей контрольных животных. QChE составляли соответственно: для мышц 0,132±0,033 и 0,093±0,024 и 0,215±±0,020 и 0,152±0,059.

Таблица 27

Активность холинэстеразы в норме и после алкогольного наркоза, определяемая в кусочках мышц и нервов (в мг/г/час)

QChE контрольных лягушек			QChE при алкогольном наркозе	
мышцы		нервы	мышцы	нервы
0,072	0,100	0,260	0,070	0,270
0,071	0,043	0,225	0,160	0,067
0,164	0,440	0,220	0,161	0,220
0,100	0,200	0,122	0,117	0,120
0,133	0,155	0,340	0,039	0,130
0,140	0,170	0,168	0,070	0,135
0,100	0,105	0,130	0,106	0,200
0,120	0,061	0,170	0,065	0,072
0,060	0,044	0,226	0,070	
0,040	0,087	0,256	0,070	
0,065	0,100	0,364	0,133	
0,286	0,107	0,174	0,100	
0,226	0,110	0,225	0,049	
0,160	0,225	0,130	0,059	
			0,130	
Среднее ... 0,132±0,033		0,215±0,020	0,093±0,024	0,152±0,059
0,064÷0,200		0,172÷0,258	0,042÷0,144	0,013÷0,291

Для мышц: $\frac{\text{QChE контроля}}{\text{QChE опыта}} = \frac{0,132}{0,093} = 1,4.$

Для нервов: $\frac{\text{QChE контроля}}{\text{QChE опыта}} = \frac{0,215}{0,152} = 1,4.$

Время полураспада составляло при этом обычно около 2 часов. Если не вносить ткани в раствор ацетилхолина, то время полураспада составляет больше 40 часов (табл. 28).

Следовательно, мы наблюдали действительно ферментативный, а не спонтанный гидролиз ацетилхолина.

Важно было выяснить, в какой мере этот гидролиз осуществляется в самом кусочке ткани (или на его поверхности) и в какой мере гидролиз идет за счет холинэстеразы, переходящей из кусочков ткани в раствор, так как действенная концентрация ингибитора может сохраниться, конечно, только в кусочке ткани, а в растворе ингибитор разводится в десятки раз. Чтобы выяснить это,

Таблица 28

Спонтанный гидролиз ацетилхолина в растворе Рингера

Время полураспада (в часах)		
45,3	24,0	142,5
109,0	72,6	32,0
35,0	24,0	31,0
16,7	16,7	14,6
17,7	15,0	31,6
16,7	32,4	17,2
12,8	82,0	46,7
82,0		
Среднее . . .	40,0± 7,4 24,6÷55,4	

мы применили прием, ранее использованный А. Г. Гинецинским и З. И. Барбашовой (1949). Мышцу помещали на 2 часа в стаканчик с 9 мл раствора Рингера при постоянной аэрации. Затем мышцу вынимали, а к раствору добавляли 1 мл ацетилхолина $1 \cdot 10^{-4}$. Ход гидролиза ацетилхолина в этих условиях иллюстрирован в табл. 29. QChE составлял в среднем 0,025 вместо 0,132 в присутствии мышцы. Следовательно, за счет холинэстеразы, перешедшей из ткани в раствор, осуществляется не более чем 22% гидролиза ацетилхолина.

Таблица 29

Холинэстеразная активность раствора Рингера после пребывания в нем мышцы (в мг/г/час)

	QChE
	0,007
	0,020
	0,061
	0,024
	0,023
	0,013
Среднее . . .	0,025±0,007 0,004÷0,046

В другой серии опытов мы определяли ход гидролиза ацетилхолина такими же мышцами и нервами после их предварительного растирания до полной гомогенности (результаты приведены в табл. 30). С растертыми тканями контрольных лягушек мы наблюдали гораздо более быстрый гидролиз, чем с интактными кусочками. QChE составляли соответственно для мышц 3,616±0,565 (вместо 0,132±0,033), а для

Таблица 30

Активность холинэстеразы в норме и после алкогольного наркоза, определяемая после гомогенизации тканей

QChE контрольных лягушек		QChE при алкогольном наркозе	
мышцы	нервы	мышцы	нервы
3,900	0,600	3,500	3,060
4,100	2,140	5,000	4,500
6,900	1,940	7,200	1,500
9,700	1,550	10,000	3,540
5,300	2,590	9,700	1,927
1,400	2,100	8,700	2,548
4,700	1,700	1,880	
8,000	0,536	1,760	
8,700	2,532	2,820	
1,000	3,488	0,944	
1,840	2,200	0,644	
1,400	2,857	1,720	
2,220	4,700	1,022	
1,344	5,000	0,255	
3,300		0,093	
3,580		0,057	
2,127		0,170	
2,421			
2,285			
1,938			
Среднее...			
3,616±0,565	2,424±0,342	3,253±0,853	2,846±0,445
2,435÷4,797	1,685÷3,163	1,455÷5,071	1,702÷3,990

$$\text{Для мышц: } \frac{\text{QChE контроля}}{\text{QChE опыта}} = \frac{3{,}616}{3{,}263} = 1{,}1$$

$$\text{Для нервов: } \frac{\text{QChE контроля}}{\text{QChE опыта}} = \frac{2{,}424}{2{,}846} = 0{,}9$$

нервов — 2,424±0,342 (вместо 0,215±0,020). С тканями наркотизированных лягушек мы получили практически те же коэффициенты: 3,263±0,853 для мышц и 2,846±±0,445 для нервов. Таким образом, в этих опытах подтвердилась невозможность выявить торможение холинэстераз in vivo обратимыми ингибиторами типа наркотиков методом растирания тканей. Абсолютные значения QChE, получаемые при растирании тканей, близки к приводимым в литературе (Nachmansohn, 1959).

В то же время при работе с интактными кусочками ткани в наших опытах отмечалось значительное торможение холинэстераз в тканях наркотизированных животных.

Описанный метод работы с «кусочком неразведенной ткани» для выявления торможения холинэстераз был проведен применительно к другим ингибиторам обратимого типа (прозерин, морфин и др.).

Полученные результаты свидетельствуют, что для обратимых ингибиторов холинэстеразы этот метод может быть использован для специальных исследований.

Отравление хинином. В 1940 г. А. П. Николаев выдвинул предположение, что хинин усиливает сократительную деятельность матки потому, что он обладает антихолинэстеразным действием и стабилизирует ацетилхолин в организме.

Антихолинэстеразное действие хинина изучалось многими авторами, но полученные результаты были весьма противоречивы. В связи с этим мы решили исследовать активность холинэстеразы при отравлении хинином (Я. С. Смусин, 1961). Это представлялось нам тем более интересным, что хинин имеет и судебно-медицинское значение, поскольку встречаются смертельные случаи от передозировки хинина, применяемого с целью плодоизгнания.

Кроме обычно применяемого в медицинской практике хлоргидрата хинина, мы исследовали также альфа-йодметилат хинина, синтезированный Г. Т. Татевосяном в 1956 г.

Были установлены средние смертельные дозы, вызывавшие смерть в течение первых суток при подкожном введении у 50% мышей ($ДЛ_{50}$). Эти дозы оказались равными для хлоргидрата хинина 0,4 г/кг, а для его альфа-йодметилата —0,14 г/кг.

Таким образом, при метилировании хинина токсичность его сильно возросла. Соотношение $ДЛ_{50}$ в весовых единицах составляет для хлоргидрата и йодметилата хинина соответственно 400 мг/кг и 140 мг/кг. В перерасчете на моли это составит 1,1 миллимоля на 1 кг и 0,3 миллимоля на 1 кг. Следовательно, токсичность хинина возросла при его альфа-метилировании в 3,7 раза. Увеличение токсичности многих фармакологических средств при их метилировании известно давно.

Нами были проведены опыты по определению активности истинной и ложной холинэстераз. Степень активности холинэстераз сравнивалась при действии равноэффективных доз обоих веществ ($ДЛ_{50}$ и $2ДЛ_{50}$). Действие хинина и его йодметилата на активность холинэстеразы in vitro изучалось биологическим методом Платтнера.

Наиболее удобно будет изложить методику на основании краткого описания типичного опыта.

План опыта:

Что приливается	Номера проб				
	1	2	3	4	5
Дистиллированная вода (в мл)	1	2	2	1	1
Сыворотка лошади (в мл)	1	1	1	1	1
Хинин $4 \cdot 10^{-5}$ (в мл)	1	—	—	1	1
Трихлоруксусная кислота 15% (в мл)	1	—	—	—	—
Ацетилхолин $1 \cdot 10^{-3}$ (в мл)	1	1	1	1	1
Контакт (в секундах)	—	60	60	60	60
Трихлоруксусная кислота 15% (в мл)	—	1	1	1	1
Высота подъема рычажка (в мм)	80/46	46		63	
Процент разрушения ацетилхолина	0/50	50		25	
T_{50} (в секундах)	—	60		120	
QChE (в мг/г/час)		30		15	
QChE (в процентах к исходному)		100		50	
Угнетение холинэстеразы (в %)		0		50	

Первая проба является контрольной: ацетилхолин в ней не разрушился, так как до его прибавления холинэстераза была денатурирована добавлением трихлоруксусной кислоты. Пробы 2 и 3 готовятся так же, как и контрольная проба, однако трихлоруксусная кислота добавляется после истечения запланированного времени контакта ацетилхолина с холинэстеразой (в нашем случае 60 секунд). Аналогичным образом готовятся пробы 4 и 5, но в отличие от проб 2 и 3, кроме холинэстеразы и ацетилхолина, в растворе во время контакта присутствует еще ингибитор — хинин. Соответственно мы уменьшали количество дистиллированной воды с тем, чтобы объем жидкости во всех пробах был одинаковым.

В разбираемом случае оказалось, что в контрольной пробе (проба 1) уменьшение концентрации ацетилхолина вдвое ведет к соответствующему снижению высоты сокращения мышцы (с 80 до 46 мм).

Теперь переходим к оценке полученных результатов методом графической интерполяции. В пробах 2 и 3 мышца сократилась в среднем до 46 мм, а в пробах 4 и 5 — до 63 мм. Это соответствует разрушению ацетилхолина на 50 и 25%. После этого мы определяем T_{50} холинэстеразы, т. е. время, необходимое для того, чтобы исходная концентрация ацетилхолина в результате ферментативного гидролиза снизилась вдвое. В данном случае T_{50} составляет 120 секунд. Таким

образом, холинэстераза оказалась угнетенной на 50% (время полураспада ацетилхолина после добавления хинина оказалось вдвое больше). Исходная концентрация хинина, вызвавшая такое угнетение, была равна $4 \cdot 10^{-5}$, но в момент экспозиции (вследствие добавления других компонентов смеси) эта концентрация была в 4 раза ниже, т. е. составляла $1 \cdot 10^{-5}$. Следовательно, хинин в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ угнетает холинэстеразу сыворотки лошади на 50%.

Однако в очень редких случаях удается сразу установить концентрацию вещества, угнетающую холинэстеразу на 50%. Как правило, при работе мы сталкивались с серией концентраций, угнетающих холинэстеразу, например, на 20%, 40%, 50% и т. д. Для того чтобы точно подобрать концентрацию вещества, угнетающую холинэстеразу именно на 50%, можно опять-таки воспользоваться графической интерполяцией, с помощью которой удается в первом приближении установить, какая концентрация исследуемого вещества угнетает холинэстеразу вдвое. Графическая интерполяция проводится в прямоугольной системе координат. По оси ординат откладываем проценты угнетения холинэстеразы, по оси абсцисс — концентрацию ингибитора. Могут быть отложены как абсолютные значения концентрации, приведенные к одной степени разведения (например, от 0,1 до $16 \cdot 10^{-8}$), так и характеристики отрицательных логарифмов этих величин.

Соединяем прямой линией две точки, характеризующие угнетение холинэстеразы ингибитором на величину, большую и меньшую 50%. Эта линия, естественно, пересечет горизонталь, соответствующую половинному угнетению холинэстеразы. Опустив из точки пересечения перпендикуляр, получаем на оси абсцисс цифровое значение искомой концентрации или характеристику его отрицательного логарифма (рис. 37, *а*).

На рис. 37 приведено вычисление концентрации ингибитора, угнетающей холинэстеразу на 50%. По горизонтали — концентрация ингибитора в абсолютных значениях, приведенных к общему знаменателю (все концентрации даны применительно к концентрации $1 \cdot 10^{-8}$). Допустим, что вещество в концентрации $10 \cdot 10^{-8}$ ($1 \cdot 10^{-7}$) угнетает холинэстеразу на 80%, а концентрация $5 \cdot 10^{-8}$ — на 40%. Находим соответствующие точки на графике и соединяем их между собой. Опустив перпендикуляр на ось абсцисс из точки пересечения проведенной нами ли-

нии с горизонталью, соответствующей 50% угнетению энзима, получаем, что исследуемое вещество будет тормозить холинэстеразу на 50% в концентрации $6{,}4 \cdot 10^{-8}$ (рис. 37, *б*).

Когда мы берем две точки, характеризующие угнетение холинэстеразы меньше или больше, чем на 50%,

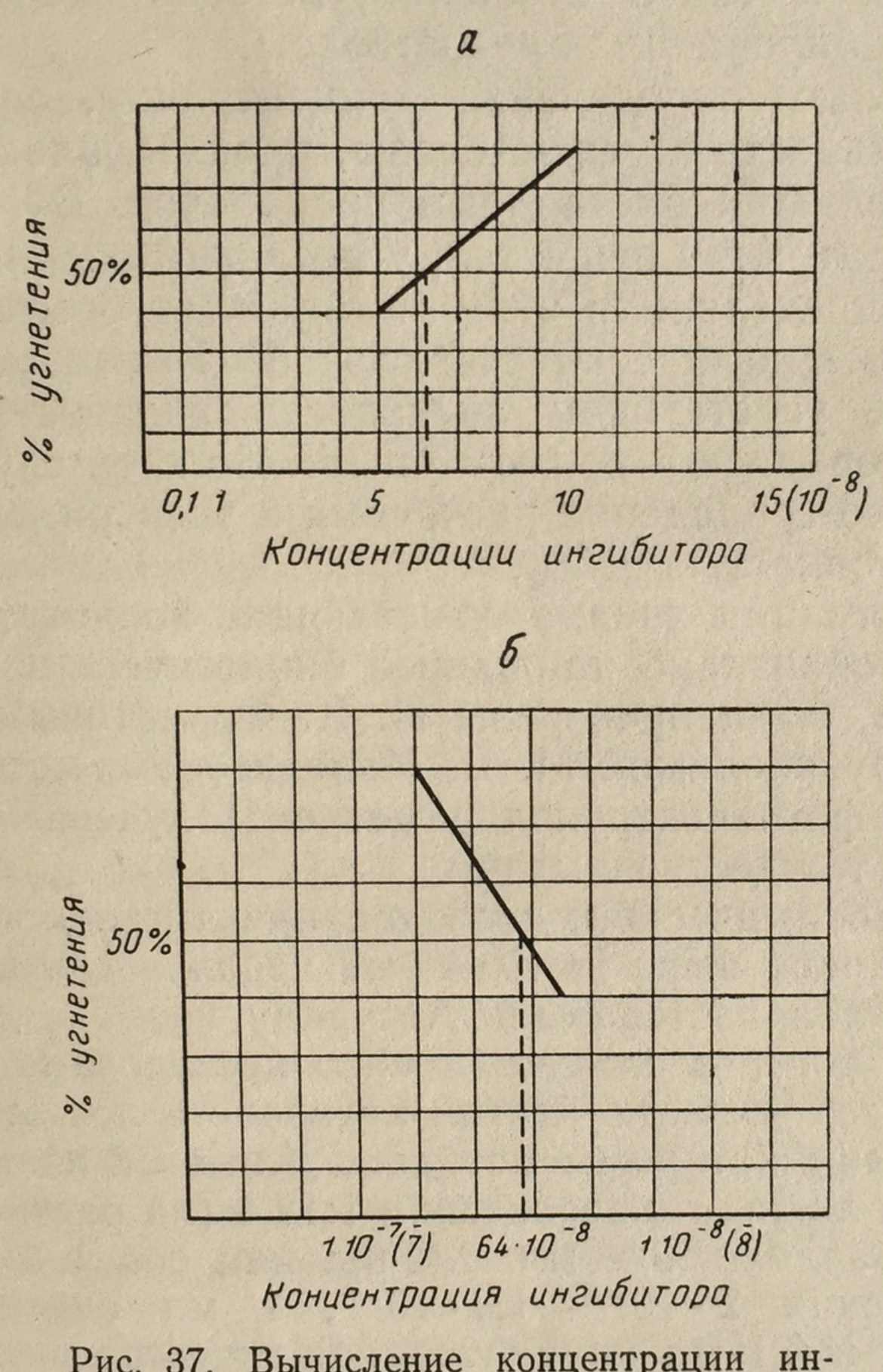


Рис. 37. Вычисление концентрации ингибитора (*а*, *б*) (объяснение см. в тексте).

то в идеальных условиях соединяющая их линия не может быть прямой. Особенно это вырисовывается, если берут точки, далеко отстоящие друг от друга (например, угнетение холинэстеразы на 20 и 80%). Получаемые экспериментальным путем промежуточные точки приводят к заключению, что в таких условиях линия, проведенная

через них, имеет ~ образный характер. Однако, как правило, в зоне 50% ингибирования холинэстеразы эта линия приближается к прямой. Поэтому в целях получения наиболее точных результатов мы высчитывали методом графической интерполяции концентрацию, угнетающую холинэстеразу на 50%, из двух точек, максимально приближенных к такой степени угнетения: например, 40 и 60% ингибирования холинэстеразы.

Повторные определения концентрации, снижающие вдвое активность холинэстеразы, производились с вновь приготовленными растворами препаратов. Во всех случаях концентрация вещества, угнетающая холинэстеразу на 50%, определяемая этим методом, от опыта к опыту оставалась практически стабильной. Высчитанная концентрация, угнетающая активность холинэстеразы на 50%, проверялась в прямом опыте. Во всех случаях было получено совпадение расчетных и экспериментальных данных с точностью ±5%.

Концентрации хинина, угнетающие холинэстеразу на 50%, первоначально найденные биологическим методом Платтнера, были проверены Н. К. Фруентовым в лаборатории, руководимой М. Я. Михельсоном, методом Хестрина на фотоэлектроколориметре. Полученные данные оказались тождественными.

Для биохимического исследования активности холинэстеразы крови быка in vitro был использован метод определения холинэстеразы по Хестрину.

Кроме того, в опытах in vitro исследовали влияние хинина и его йодметилата на активность ложной холинэстеразы индикаторным методом. Для этой цели к 1 мл сыворотки лошади в разведении 1:12,4 (на растворе Рингера) добавляли 0,5 мл хинина или его йодметилата в разведении $2 \cdot 10^{-3}$—$1{,}6 \cdot 10^{-5}$, 1 мл ацетилхолина $1 \cdot 10^{-2}$ М и 0,1 мл индикатора. В качестве индикатора был использован 0,025% раствор фенолрота в фосфатном буфере (pH=7,8). Исследования производились на ФЭК-М с использованием зеленого светофильтра (полоса поглощения 550 mμ) и кюветы 5,050 мм.

В опытах in vitro методами Платтнера и Хестрина не удалось отметить угнетения активности холинэстеразы мозга и мышц белых мышей и крови быка при действии хлоргидрата хинина и его йодметилата даже в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$. Увеличивать концентрацию мы не сочли

целесообразным, так как при этом могло бы проявиться уже неспецифическое действие препаратов на холинэстеразу.

В опытах in vitro индикаторным методом исследовали активность холинэстеразы сыворотки лошади. Оказалось, что концентрация хинина и его йодметилата, угнетающая холинэстеразную активность на 50%, составляет $8 \cdot 10^{-6}$—$7 \cdot 10^{-6}$. Близкие цифры были получены также при исследовании методом Платтнера.

В контрольных опытах на неотравленных белых мышах мы определили коэффициенты активности холинэстеразы головного мозга, мышц и печени. Затем мы установили коэффициенты активности холинэстеразы головного мозга и мышц белых мышей, отравленных хлоргидратом хинина в дозах $ДЛ_{50}$ и $2ДЛ_{50}$, а также йодметилатом хинина в дозах $ДЛ_{50}$ и $2ДЛ_{50}$ и печени в дозе $ДЛ_{50}$. Полученные результаты сравнивали между собой. Ниже приводятся сводные данные этих опытов (табл. 31).

Из табл. 31 видно, что при отравлении белых мышей хлоргидратом хинина в дозе $ДЛ_{50}$ активность холинэстеразы головного мозга и мышц не снижается. Отмечается лишь некоторое (на 15,6%) угнетение активности холинэстеразы печени. При отравлении животных йодметилатом хинина наблюдается небольшое снижение активности фермента головного мозга, мышечной ткани и печени соответственно на 23,9%; 8,6% и 17,2%. При отравлении теми же препаратами, но в дозе $2ДЛ_{50}$ отмечалось незначительное снижение активности холинэстеразы только мышечной ткани — на 8% (активность печени не исследовали). Гистохимическим методом тоже не удалось получить сколько-нибудь убедительных данных об изменении активности холинэстеразы при действии указанных препаратов.

Таким образом, хинин и его йодметилат в опытах in vitro не снижают активность холинэстеразы головного мозга и мышц белых мышей, но вызывают угнетение холинэстеразы сыворотки лошади. В опытах in vivo незначительное угнетение холинэстеразной активности было отмечено только в печени, а при действии йодметилата хинина — небольшое угнетение холинэстеразной активности головного мозга, мышечной ткани и печени.

Отравление морфином. Угнетающее действие морфина на холинэстеразу показали в 1936 г. Kahane и Lewy,

Таблица 31

Коэффициент активности холинэстеразы (QChE) мозга, мышц и печени белых мышей при отравлении хлоргидратом хинина и его йодметилатом (в мг/г/час)

Вещество и доза	QChE мозга	В %	Процент угнетения	QChE мышцы	В %	Процент угнетения	QChE печени	В %	Процент угнетения
Контроль (декапитация)	102,1± 4,7 91,5÷112,7	100	0	17,4± 1,6 13,8÷21,0	100	0	23,8± 2,9 15,7÷31,9	100	0
Хинин, $ДЛ_{50}$	102,6± 8,6 80,5÷124,7	100	0	17,9± 4,9 5,3÷30,5	100	0	20,1± 4,2 8,4÷31,8	84,4	15,6
Йодметилат хинина, $ДЛ_{50}$	77,7± 6,6 61,5÷33,9	76,1	23,9	15,9± 1,8 11,5÷20,3	91,4	8,6	19,7± 1,2 16,4÷23,0	82,7	17,2
Хинин, $2ДЛ_{50}$	107,7± 10,8 67,2÷148,2	10	0	16,0± 0,9 12,6÷19,4	92,0	8,0			
Йодметилат хинина, $2ДЛ_{50}$	108,3± 6,6 91,3÷125,3	100	0	19,2± 1,2 16,3÷22,4	100	0			

а также F. и M. Bernheim, А. А. Зубков с сотрудниками (1937), Kuhn и Searles и др. (1938). Прямые определения степени торможения холинэстеразы крови и мозга морфинизированных крыс были проведены М. Я. Михельсоном (1939). Опыты ставились по методу Шейнера. Активность холинэстеразы крови при действии морфина не отличалась от цифр контрольных опытов. Холинэстераза головного мозга, напротив, была угнетена на 29—33% при дозах 0,02—0,04 г/кг солянокислого морфина. Различные результаты опытов с кровью и мозгом объясняются автором более высокой концентрацией морфина в мозгу. Если учесть, что метод Шейнера требует разведения мозговой ткани в 40—80 раз, то при этом концентрация ингибитора может соответственно понизиться. Комплекс энзим — ингибитор может в таких условиях частично диссоциировать и степень торможения снизиться. Поэтому автор предполагает, что in vivo торможение холинэстеразы значительно сильнее.

Mitchell и De Joung (1954) нашли, что на бронхиальную мускулатуру человека и собаки (отрезки бронхов) морфин действия не оказывает (и на фоне прозерина), однако после морфина эффект ацетилхолина усиливается. К подобным результатам пришла Е. А. Афанасьева (1954), показавшая на примере действия морфина и физостигмина на перистальтику кишечника, что морфин не оказывает непосредственного влияния на окончания холинергических нервов. Joung и др. (1955), отмечая, что морфин in vitro угнетает холинэстеразу, вместе с тем предполагают, что прямой связи между обезболивающим действием морфина и его антихолинэстеразными эффектами не существует.

Таким образом, на основании литературных данных можно считать несомненным некоторое тормозящее действие морфина на активность холинэстеразы мозга in vivo и усиление многих эффектов морфина под влиянием сильных ингибиторов типа эзерина. Однако вопрос, в какой мере и каким образом вмешательство морфина в ацетилхолиновый метаболизм может быть ответственным за фармакологическое действие морфина, еще не решен.

Приступая к изучению вопроса о действии морфина на активность холинэстеразы органов и тканей, нас интересовало, происходит ли изменение активности холинэстеразы при экспериментальном отравлении морфином

и нельзя ли использовать этот феномен для целей судебной медицины.

Работа была проведена биохимическим и биологическим методами. Исследовалась активность истинной холинэстеразы головного мозга и мышц белых мышей, а также крови человека и ложной холинэстеразы сыворотки лошади и печени белых мышей. Исследования проводились как in vitro, так и in vivo (Я. С. Смусин, 1961).

Мы определили среднюю смертельную дозу, вызывавшую смерть в течение первых суток при подкожном введении солянокислого морфина у 50% мышей ($ДЛ_{50}$). Эта доза оказалась равной 440 мг/кг.

В опытах in vitro методом Хестрина мы исследовали активность холинэстеразы головного мозга, мышечной ткани и печени белых мышей, а также крови человека и сыворотки лошади. Проведенные опыты in vitro показывают, что морфин снижает активность холинэстеразы головного мозга белых мышей на 50% в концентрации $1{,}3 \cdot 10^{-3}$, мышечной ткани — $2{,}12 \cdot 10^{-3}$ и печени — $4{,}24 \cdot 10^{-3}$. Концентрация морфина, угнетающая холинэстеразную активность на 50%, составляет для крови человека $1{,}19 \cdot 10^{-3}$ и для сыворотки лошади — $3{,}34 \cdot 10^{-4}$.

В опытах in vivo методом Хестрина мы исследовали активность холинэстеразы головного мозга, мышечной ткани и печени при отравлении белых мышей морфином в дозе $ДЛ_{50}$. Была исследована также активность холинэстеразы головного мозга методом «неразведенной ткани» (Я. С. Смусин, 1962). В табл. 32 приводятся суммарные данные по определению активности холинэстеразы головного мозга, мышечной ткани и печени белых мышей, отравленных $ДЛ_{50}$ морфина.

Как видно из табл. 32, при отравлении белых мышей морфином в дозе $ДЛ_{50}$ наблюдалось снижение активности холинэстеразы головного мозга на 37,7% (определение велось методом Хестрина). Почти аналогичные данные были получены при определении активности холинэстеразы в «кусочке неразведенной ткани» (снижение активности холинэстеразы на 34,4%). Снижения активности холинэстеразы мышечной ткани и печени белых мышей при отравлении морфином не найдено. Эти результаты соответствуют литературным данным (по данным

Таблица 32

Коэффициент активности холинэстеразы (QChE) головного мозга, мышечной ткани и печени белых мышей, отравленных морфином в дозе $ДЛ_{50}$

	QChE мозга	В %	Процент угнетения	QChE мышцы	В %	Процент угнетения	QChE печени	В %	Процент угнетения
				Метод Хестрина					
Контроль (декапитация)	69,8± 7,1 54,6÷85,0	100	0	14,1± 1,3 11,3÷16,9	100	0	30,6± 6,5 16,3÷44,9	100	0
Морфин	43,5±11,3 16,8÷70,2	62,3	37.7 8	15,2± 2,7 8,8÷21,6	100	0	32,4± 7,1 15,8÷44,0	100	0
				Метод «неразведенной ткани»					
Контроль (декапитация)	0,195±0,030 0,131÷0,295	100	0						
Морфин	0,128±0,017 0,092÷0,164	65,6	34,4						

М. Я. Михельсона, активность холинэстеразы головного мозга морфинизированных крыс снижается на 29—33%).

Литературные данные и полученные нами результаты не позволяют полагать, что антихолинэстеразное действие морфина играет какую-либо значительную роль в механизме его действия. Вместе с тем представляется возможным использовать метод определения активности холинэстеразы тканей в качестве дополнительного метода при судебно-медицинской диагностике отравлений морфином. Угнетение активности холинэстеразы головного мозга примерно на $^1/_3$ при отсутствии угнетения активности фермента в мышцах и печени может указывать на возможное отравление морфином.

Отравление стрихнином занимает одно из значительных мест в судебной токсикологии. Издавна этот яд применяется для самоубийства. Описано немало случаев убийства посредством стрихнина, несмотря на его горький вкус (Н. В. Попов, 1950).

Стрихнин находится в азиатских и африканских видах растений Strychnos, главным образом в семенах чилибухи, рвотного корня и бобов св. Игнатия. Наиболее употребительна азотнокислая соль стрихнина — чрезвычайно горький кристаллический порошок. Механизм действия стрихнина на организм довольно подробно изучен. Однако существует ряд спорных и неясных вопросов. К числу их относится вопрос о действии стрихнина на холинэстеразу тканей.

Nachmansohn (1938, 1939) высказал предположение, что в основе фармакологического эффекта стрихнина (в частности, судорог) главную роль играет его антихолинэстеразное действие. Ю. Зильбер и Р. Райз (цит. по М. Я. Михельсону, 1948) нашли, что содержание ацетилхолина в центральной нервной системе лягушки изменяется в одинаковом направлении при судорогах, вызванных эзерином, и при стрихниновых судорогах. Они определили, что при стрихнине содержание ацетилхолина увеличивается на 33%, а при эзерине — на 40,6%. Отсюда Ю. Зильбер и Р. Райз предполагают, что поскольку единственный достоверно известный механизм центрального действия эзерина состоит в торможении холинэстеразы, постольку эти данные говорят в пользу предположения, что угнетение этого фермента имеет значение и в механизме судорожного действия стрихнина.

Однако клиника отравления стрихнином во многом отличается от клиники отравления эзерином, прозерином, ДФФ, табуном и другими антихолинэстеразными веществами: при отравлении стрихнином, например, мало нарушается психическая деятельность, нет спазма бронхиальной мускулатуры, судороги носят не клонический, а тетанический характер (Н. К. Фруентов, 1961).

Наши опыты (Я. С. Смусин, 1963) проводились на белых мышах как in vitro, так и in vivo. Активность холинэстеразы исследовалась химическим методом Хестрина.

В ориентировочных опытах мы установили дозу, вызывающую гибель 50% мышей при подкожном введении азотнокислого стрихнина в течение суток ($ДЛ_{50}$). Эта доза оказалась равной 1 мг/кг.

В опытах in vitro исследовали активность холинэстеразы головного мозга, спинного мозга, мышечной ткани и печени белых мышей при действии стрихнина. Оказалось, что стрихнин снижает активность холинэстеразы головного мозга, спинного мозга, печени и мышечной ткани белых мышей в концентрации $5{,}04 \cdot 10^{-4}$—$7{,}07 \cdot 10^{-4}$

В опытах in vivo мы исследовали активность холинэстеразы головного мозга, спинного мозга, печени и мышечной ткани белых мышей при отравлении стрихнином в дозе $ДЛ_{50}$.

Ниже приводятся суммарные результаты опытов (табл. 33).

Таблица 33

Коэффициент активности холинэстеразы головного мозга, спинного мозга, мышечной ткани и печени белых мышей, отравленных стрихнином в дозе $ДЛ_{50}$ (в мг/г/час)

Ткань	Контроль			Отравление		
	QChE	в %	% угнетения	QChE	в %	% угнетения
Головной мозг	40,0± 1,3 36,8÷43,2	100	0	27,6± 3,4 19,9÷35,3	69	31
Спинной мозг	67,0± 5,5 53,7÷80,3	100	0	50,4± 0,5 49,2÷51,6	75,2	24,8
Мышца	16,4± 1,6 12,0÷20,8	100	0	10,5± 1,0 8,2÷12,8	64	36
Печень	30,1± 0,5 29,0÷31,2	100	0	30,7± 0,8 29,0÷32,4	100	0

Из табл. 33 видно, что при отравлении белых мышей стрихнином в дозе $ДЛ_{50}$ отмечается угнетение активности холинэстеразы головного мозга на 31%, спинного мозга — на 24,8% и мышечной ткани — на 36%. Снижения активности холинэстеразы печени при отравлении стрихнином не найдено. Эти результаты совпадают с данными Ю. Зильбера и Р. Райза, обнаруживших увеличение содержания ацетилхолина центральной нервной системы лягушек при стрихниновых судорогах на 33%.

В опытах in vitro было установлено, что концентрация стрихнина, угнетающая холинэстеразную активность на 50%, для головного мозга составляет $5{,}94 \cdot 10^{-4}$, для спинного мозга — $6{,}4 \cdot 10^{-4}$, для мышечной ткани — $7{,}07 \cdot 10^{-4}$, для печени — $5{,}04 \cdot 10^{-4}$.

Полученные результаты свидетельствуют, что при отравлении стрихнином в дозе $ДЛ_{50}$ отмечается угнетение активности холинэстеразы головного и спинного мозга, а также мышечной ткани (содержащих истинную холинэстеразу) приблизительно на $^1/_3$—$^1/_4$ исходной активности. Холинэстераза печени (ложный фермент) при этом не изменялась. Такое сравнительно слабое угнетение активности истинной холинэстеразы отрицает предположение Nachmansohn (1948) и др. о значительной роли антихолинэстеразного действия в возникновении стрихниновых судорог. Вероятно, антихолинэстеразное действие стрихнина представляет собой второстепенный эффект и играет лишь небольшую роль в механизме токсического действия стрихнина.

Вопрос о действии стрихнина на активность холинэстеразы представляет значительный интерес и для судебной медицины, так как выяснение этого токсического действия может оказать влияние на поиски дополнительных методов посмертной диагностики отравлений стрихнином. Отравления людей встречаются как в случаях суицидных попыток, так и в виде несчастных случаев.

В последние годы для лечения отравлений барбитуратами в качестве антидота стали широко применять стрихнин (см. Н. К. Фруентов, 1961). Больным вводят внутривенно большие дозы стрихнина (по 10 мг каждый час; при необходимости дозу значительно увеличивают). И все же в случаях наступления смерти может возникнуть во-

прос, последовала ли смерть от отравления барбитуратами или от отравления стрихнином. Как в том, так и в другом случае судебно-химические исследования, как правило, указывают на большое содержание во внутренних органах барбитурата и стрихнина. Морфологические же изменения при этих отравлениях дают общую картину асфиксии. Вместе с тем установленный факт угнетения активности истинной холинэстеразы головного и спинного мозга и мышечной ткани на $^1/_3$—$^1/_4$ при отсутствии угнетения ложной холинэстеразы печени может служить дополнительным критерием при судебно-медицинском определении смертельного отравления стрихнином.

Глава VI

СХЕМА СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОТРАВЛЕНИЙ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ

Наши материалы в сочетании с имеющимися литературными данными позволяют предложить следующую приближенную схему судебно-медицинской диагностики отравлений антихолинэстеразными веществами.

При наружном исследовании трупа обращают на себя внимание быстрое появление и значительная выраженность трупного окоченения, а также миоз. При внутреннем исследовании обнаруживаются признаки, характеризующие картину асфиксии: жидкая кровь в полостях сердца и крупных сосудах, застойное полнокровие внутренних органов, мелкоточечные кровоизлияния под эпикардом и висцеральной плеврой, а также следы гиперсекреции желез в виде наличия вспененной слизи в просвете дыхательных путей и «отшнуровывающаяся» перистальтика кишечника. В редких случаях отравления, когда смерти предшествовали особенно бурные судороги, возможны полные или частичные отрывы отдельных мышц от точек прикрепления.

При гистологическом исследовании внутренних органов и головного мозга, помимо признаков, встречающихся при асфиксии, наблюдается спазм гладких мышц бронхов и кишечника.

Однако эти признаки, часть из которых хотя и являются специфичными, встречаются не всегда. В некоторых случаях при заведомом отравлении ФОС наблюдается не миоз, а мидриаз. Более часто нехарактерные признаки отмечаются при отравлении такими ФОС, действие которых развивается медленно (например, октаметил, тиофос и др.). Все это в значительной мере затрудняет посмертную диагностику и делает невозможным обоснование заключения о причине смерти на основании лишь судебно-медицинского исследования трупа.

Поэтому при малейшем подозрении на наступление смерти от отравления антихолинэстеразным веществом должно быть проведено специальное исследование. Наиболее адекватным методом такого исследования, позволяющим решить вопрос, относится ли яд, вызвавший смерть, к антихолинэстеразным веществам, является определение активности холинэстеразы органов и тканей трупа и сравнение ее с холинэстеразной активностью органов и тканей трупов людей, смерть которых наступила не от отравления антихолинэстеразными веществами. Использование методов определения активности холинэстеразы для целей судебно-медицинской диагностики основывается также на том факте, что холинэстераза в течение сравнительно длительного времени сохраняется в трупе.

Какие же выводы можно сделать на основании результатов специальных исследований, проведенных тем или иным методом?

Снижение активности холинэстеразы ткани, обнаруженное при исследовании ее в гомогенате, указывает на отравление антихолинэстеразным веществом необратимого действия.

Низкая холинэстеразная активность периферических тканей при нормальной или почти нормальной холинэстеразной активности тканей центральной нервной системы может свидетельствовать об отравлении антихолинэстеразным веществом, не способным проникать через гемато-энцефалический барьер в мозг (октаметил, а также ФОС, имеющие в молекуле сульфониевую или аммониевую группу). Отсюда следует, что при исследовании трупа необходимо одновременно определять активность холинэстеразы и в мозгу, и в периферических тканях. Такой прием может дать более конкретное заключение о природе яда, вызвавшего отравление.

Если есть подозрение на отравление ФОС, содержащим паренитрофенил (например, фосфакол, тиофос, армин и др.), в качестве дополнительного приема следует рекомендовать проведение судебно-химического исследования мочи на обнаружение паранитрофенола. При приеме больших доз яда (при суицидных попытках) можно исследовать на паранитрофенол желудочное содержимое, рвотные массы, промывные воды и т. д.

Важно не переоценить значение негативного результата исследования, если активность холинэстеразы была определена биологическим или биохимическим методом. Эти методы позволяют выявить только угнетение холинэстеразной активности, вызванное необратимыми ингибиторами данного фермента. Негативный результат (уровень активности холинэстеразы, близкий к нормальному), полученный обычными методами, связанными с разведением ткани, позволяет только сделать вывод, что причиной отравления не явилось антихолинэстеразное вещество необратимого действия.

Вопрос о том, не имело ли место отравление обратимым антихолинэстеразным веществом, должен прежде всего решаться судебно-химическим исследованием. В таком случае методы определения активности холинэстеразы могут быть использованы только в качестве дополнительных способов судебно-медицинской диагностики. Если биологическими и биохимическими методами будет обнаружено понижение холинэстеразной активности тканей, то это может служить дополнительным доводом в пользу того, что отравление вызвано антихолинэстеразным веществом.

При отрицательном же результате исследования биологическими или биохимическими методами можно использовать гистохимический метод, а также метод исследования активности холинэстеразы в «кусочке неразведенной ткани».

Результаты полного специального исследования могут дать судебно-медицинской экспертизе ряд дополнительных данных, помогающих более конкретно охарактеризовать яд, если он является антихолинэстеразным веществом. Нормальная или почти нормальная активность холинэстеразы тканей, определяемая биологическими или биохимическими методами, при сниженной активности холинэстеразы в срезах или «кусочке» ткани может служить основанием для предположения, что произошло отравление веществом, обратимо тормозящим холинэстеразу (например, эзерин, прозерин, наркотики, в том числе и этиловый спирт, а также тетраэтилсвинец, морфин и др.).

Что касается прижизненной судебно-медицинской диагностики отравлений антихолинэстеразными веществами, то она основывается прежде всего на клинических

симптомах отравления. Наличие у пострадавшего симптомов, позволяющих подозревать отравление антихолинэстеразным веществом, является показанием для специальных (биологических или биохимических) исследований. Наиболее целесообразно в этих случаях определять у пострадавшего активность холинэстеразы сыворотки крови, поскольку большинство ФОС (в том числе почти все фосфорорганические инсектициды) являются избирательными ингибиторами сывороточной холинэстеразы. В тех случаях, когда неизвестен нормальный уровень холинэстеразы больного, однократное исследование может не дать достаточных оснований для диагноза. Причиной такого затруднения являются индивидуальные варианты нормальной активности холинэстеразы. В подобных случаях необходимо через некоторое время (2—3 недели) провести повторное исследование. Если при этом активность холинэстеразы крови окажется достоверно выше, чем при первом исследовании, значит при первом исследовании холинэстераза была сниженной.

Само собой разумеется, что лечебные мероприятия, направленные на устранение у больного симптомов гиперфункции холинергических структур, должны проводиться немедленно. На протяжении срока наблюдения (в промежутке между первым и повторным исследованием холинэстеразной активности) возможность контакта пострадавшего с ФОС должна быть полностью исключена.

Если есть подозрение на отравление ФОС, содержащими паранитрофенил, то исследование мочи больного на паранитрофенил должно производиться уже при первичном обследовании пострадавшего.

ЛИТЕРАТУРА

а) Отечественная

Алуф М. А. Фармакол. и токсикол., 1955, 2, 21—27.

Андреев В. В. В кн.: Современные вопросы авиатоплива, 1933.

Антонюк П. К. Фармакол. и токсикол., 1951, 4, 14—16.

Арбузов А. Е. (ред.) Химия и применение фосфорорганических соединений. Труды Первой конференции. М., 1957; Труды Второй конференции. М., 1962; Программа Третьей конференции. М., 1965.

Афанасьева Е. А. Фармакол. и токсикол., 1954, 5, 23—26.

Бандарин В. А. и др. Сб.: Материалы научной сессии Минского медицинского института. Минск, 1957, 3—5.

Баранова Н. Ф. Бюлл. экс. биол. и мед., 1952, 8, 47—50.

Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Рига, 1959.

Белошапко П. А. и Фой А. М. Обезболивание и ускорение родов. М., 1954.

Борисов П. И. и Розенгарт В. И. Вопр. мед. химии, 1950, 2, 53—56.

Брахнова И. Т. Автореф. дисс. Киев, 1959.

Бурый В. С. Сб.: Химия и применение фосфорорганических соединений. Труды Первой конференции. М., 1957, 376—381.

Бурый В. С. Тезисы докладов 1-й Всесоюзной конференции по гигиене и токсикологии инсектофунгицидов. Киев, 1957, 29—30.

Бутенас Г. Б. Сборник работ факультета при I ЛМИ. Л., 1958, 3, 91—93.

Бухмастова А. М. и Смусин Я. С. Сборник научных работ Челябинского общества судебных медиков. Челябинск, 1963, 87—90.

Вайль С. С. Патологическая анатомия поражений, вызываемых отравляющими веществами. Л., 1958.

Вашков В. И. и Шнайдер Е. В. Хлорофос. М., 1962.

Веллинг Е. И. и Преображенская А. А. Фармакол. и токсикол., 1946, 5, 48—49.

Вязовская Р. Д., Мастбаум И. С., Симон И. Б. Арх. пат., 1956, 3, 114—116.

Гавриленко И. С. Дисс. Л., 1960.

Гинецинский А. Г. и Барбашова З. И. Труды Физиологического института имени И. П. Павлова, 1949, 4, 149—156.

Годовиков Н. Н., Зеймаль Э. В., Кабачник М. И., Михельсон М. Я. Сб.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравлений. М., 1962, 203—205.
Голиков С. Н. и Розенгарт В. И. Фармакология и токсикология фосфорорганических соединений. Л., 1960.
Голиков С. Н. и Розенгарт В. И. Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества. Л., 1964.
Гольдблатт М. В. и Гольдблатт Ю. Некоторые проблемы гигиены труда и профессиональной патологии. М., 1960.
Григорьева Л. М. Фармакол. и токсикол., 1953, 2, 62.
Григорьева Л. М. и Парибок В. П. Цит. по Л. М. Григорьевой, 1953.
Грузова И. К., Магазаник Л. Г., Михельсон М. Я., Рожкова Е. К., Рыболовлев Р. С., Семенов И. В., Смусин Я. С., Цирк К. Г. Тезисы докладов IX съезда Всесоюзного общества физиологов, биохимиков и фармакологов. Москва—Минск, 1959, т. 2, 95—96.
Данилов А. Ф. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957, с. 418—424.
Дроздова З. А. Акуш. и гин., 1950, 6, 24—25.
Другов Ю. В. (ред.) Санитарно-химическая защита. М., 1959.
Дяблова П. Е. Фармакол. и токсикол., 1950, 2, 45—48.
Зеймаль Э. В. и Михельсон М. Я. В кн.: Гистогематические барьеры. М., 1961, 166—178.
Зеймаль Э. В., Михельсон М. Я., Рыболовлев Р. С. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957, 424—443.
Зеймаль Э. В., Михельсон М. Я., Фруентов Н. К. Сб.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1962, с. 403—424.
Зеймаль Э. В. и Рыболовлев Р. С. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957, с. 338—354.
Землянко А. Ф., Фартушный А. Ф., Балыкин В. Н. Проблемы криминалистики и судебной экспертизы. Алма-Ата, 1965, 400—401.
Зубков А. А. и др. Сборник докладов на VI съезде физиологов, фармакологов и биохимиков. Тбилиси, 1937, 371—377.
Зубкова С. Р. и Правдич-Неминская Т. В. Рефераты АН СССР, Отд. биол. наук, 1945, 353.
Изотова Т. Е., Неклесова И. Д., Горюшин В. А., Кудрина М. А. Сб.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1957, 491—502.
Ильина-Какуева Е. И. Бюлл. экспер. биол. и мед., 1958, 10, 113—116.
Исак Ф. Сборник трудов кафедры судебной медицины I ЛМИ. Л., 1958, 2, 191—194.
Кабачник М. И., Бресткин А. П., Михельсон М. Я. О механизме физиологического действия фосфор-

органических соединений. IX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. М., 1965.
Каган Ю. С. Фармакол. и токсикол., 1956, 2, 49—52.
Каган Ю. С. Труды первой Всесоюзной конференции по гигиене и токсикологии инсектофунгицидов. М., 1959, 187—208.
Каган Ю. С. Физиол. журн. (Киев), 1959, 1, 110—118.
Каган Ю. С. Токсикология фосфорорганических инсектицидов и гигиена труда при их применении. М., 1963.
Каган Ю. С. и Бурый В. С. Автореф. докладов Научной сессии Киевского института гигиены труда и профзаболеваний. Киев, 1956, 78—81.
Каган Ю. С. и Иванова З. В. Фармакол и токсикол., 1961, 2, 220—223.
Каган Ю. С. и Маковская Е. И. Физиол. журн. (Киев), 1957, 3, 77.
Каган Ю. С. и Маковская Е. И. Арх. пат., 1960, 9, 44—49.
Кадыков Б. И. Тезисы докладов Всесоюзной конференции по гигиене и токсикологии инсектофунгицидов. Киев, 1957, 52.
Казакевич М. А. Невропатол. и психиатр., 1954, 68, 633—637.
Каменецкая Б. И. Автореф. дисс. М., 1959.
Кандибур Р. И. Судебномедицинская экспертиза, 1958, 4, 52—53.
Карасик В. М. Успехи совр. биол., 1946, 1, 1.
Карпович-Егорькова А. С. Дисс. Л., 1957.
Кибяков А. В. Химическая передача нервного возбуждения. Л., 1964.
Кильби Б. А. Сб.: Химический метод борьбы с вредными насекомыми и клещами. М., 1956, 157—178.
Кривоглаз Б. А. Клиника и лечение интоксикаций ядохимикатами. Л., 1965.
Крючкова В. А. Сб.: Материалы Объединенной научной сессии по хлопководству. Ташкент, 1958, 2, 345—349.
Крючкова В. А. Труды 1-й Научной конференции по гигиене и токсикологии инсектофунгицидов. М., 1959, 93—98.
Кундиев Ю. И. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравлений. М., 1962, 206—214.
Куприянов П. А., Михельсон М. Я., Мнджоян А. Л. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957, 319—322.
Лазарев Н. В. Химически вредные вещества в промышленности. М., 1951.
Лазарев Н. В. (ред.) Руководство по фармакологии. Л., 1961.
Лейкин Д. Б., Браун А. В. Сб.: Проблемы криминалистики и судебной экспертизы. Алма-Ата, 1965, 402.
Локтионов С. И. Фармакол и токсикол., 1960, 3, 282.
Лошадкин Н. А. В кн.: Б. Сондерс. Химия и токсикология органических соединений фосфора и фтора. М., 1961.
Лошадкин Н. А. В кн.: Р. О' Брайн. Токсические эфиры кислот фосфора. М., 1964.

Лукомская Н. Я. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957, 65—79.

Люберецкий Х. З., Гуревич Б. Э. Гигиена и токсикология важнейших инсектофунгицидов, применяемых в сельском хозяйстве, главным образом в хлопководстве. Ташкент, 1961.

Магазаник Л. Г. Дисс. Л., 1959.

Мазикова О. Б. Судебномедицинская экспертиза, 1963, 1, 3—6.

Маковская Е. И. Патологическая анатомия отравлений ядохимикатами. М., 1967.

Мачабели М. Е., Таранко М. И., Гамбашидзе Г. М. Тезисы докладов 1-й Всесоюзной конференции по гигиене и токсикологии инсектофунгицидов. Киев, 1957, 90.

Мдинарадзе В. Д. Тезисы докладов 1-й Всесоюзной конференции по гигиене и токсикологии инсектофунгицидов. Киев, 1957, с. 105.

Мдинарадзе В. Д. Труды 1-й Всесоюзной конференции по гигиене и токсикологии инсектофунгицидов. М., 1959, с. 223—226.

Мельников Н. Н. Успехи химии, 1953, 3, 253.

Мельникова А. П. Материалы к научной конференции Челябинского медицинского института. Челябинск, 1965, т. II, 258—263.

Мельникова А. П. Тезисы IV Всесоюзного съезда патологоанатомов. Кишинев, 1965, 44—45.

Мельникова А. П. Активность холинэстеразы нервных элементов сердца при коронарной недостаточности. Дисс. Л., 1967.

Митрофанов П. И. Труды Всесоюзного института защиты растений. Л., 1956, в. 7, 69—74.

Михельсон М. Я. Действие наркотиков на холинэстеразу. Л., 1948.

Михельсон М. Я. Успехи совр. биол., 1948, 3, 321—344.

Михельсон М. Я. Новости медицины, 1952, 30, 61—69.

Михельсон М. Я. (ред.). Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957.

Михельсон М. Я. Труды Совещания по вопросам роли нейро-гуморальных и эндокринных факторов в деятельности нервной системы в норме и патологии. М.—Л., 1959, с. 5—14.

Михельсон М. Я., Зеймаль Э. В., Фруентов Н. К., Яковлев В. А. Антихолинэстеразные вещества. Руководство по фармакологии под ред. Н. В. Лазарева. Л., 1961, т. 1, 205—236.

Михельсон М. Я., Мнджоян А. Л., Хромов-Борисов Н. В., Рыболовлев Р. С., Зеймаль Э. В., Горелик А. М., Дардымов И. В. Тезисы докладов Совещания по проблеме связи между структурой и действием лекарственных веществ. Тарту, 1956, с. 62—63.

Михельсон М. Я., Рожкова Е. К., Саватеев Н. В. Бюлл. экспер. биол. и мед., 1954, 2, 7—12.

Наумов В. А. Активность холинэстеразы при травматическом шоке и кровопотере. Канд. дисс. Челябинск, 1968.
Неклесова И. Д. Природа, 1957, 4, 27—33.
Неклесова И. Д. Тезисы докладов 1-й Всесоюзной научной конференции по гигиене и токсикологии инсектофунгицидов. Киев, 1957, 113—114.
Неклесова И. Д., Кудрина М. А. Труды Казанского филиала АН СССР, 1956, в. 2, 79—103.
Николаев А. П. Нервно-гуморальные факторы в регуляции родовой деятельности женщины. М., 1940.
Николаев П. М. Экспериментальные основы фармакологии и токсикологии, 1941.
Паволоцкий Ш. И. Рефераты научных докладов Третьей расширенной научной конференции Одесского отделения Украинского научного общества судебных медиков и криминалистов. Одесса, 1956, 33—35.
Паньшина Т. Н. Фармакол. и токсикол., 1963, 4, 476—484.
Паньшина Т. Н. Бюлл. экспер. биол. и мед., 1963, 12, 56—60.
Паньшина Т. Н. и Маковская Е. И. В кн.: Гигиена и физиология труда, производственная токсикология, клиника профзаболеваний. Киев, 1963, 96—102.
Панюков А. Н. Тезисы докладов 1-го Всесоюзного биохимического съезда. М.—Л., 1963, т. II, 134.
Пайкин Д. М., Шабанова М. П., Гампер Н. М., Ефимова Л. Ф. Сб.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1957, 408—419.
Пеккер Г. Я. Тезисы докладов 11-й расширенной конференции Ленинградского отделения ВНОСМиК. Л., 1961, с. 157—158.
Пеккер Г. Я. Арх. пат., 1963, 6, 57—62.
Пеккер Г. Я. Арх. пат., 1963, 7, 180—183.
Петров В. С. Фармакол. и токсикол., 1961, 1, 88—94.
Петров Л. П. Ядовитые технические жидкости. Глава в руководстве под ред. Ю. В. Другова. М., 1959.
Пирс Э. Гистохимия. М., 1962.
Плисецкая Э. М. Цитология, 1961, 3, 20—33.
Покровский А. А. Фармакол. и токсикол., 1950, 1, 35—37.
Покровский А. А. Вопр. мед. химии, 1960, 3, 228—243.
Покровский А. А. Воен.-мед. ж., 1960, 1, 34.
Покровский Е. А., Митрофанов П. И. Сб.: Органические инсектофунгициды. М., 1955, 75—81.
Попов Н. В. Судебная медицина. М., 1950.
Португалов В. В. Очерки гистофизиологии нервных окончаний. М., 1955.
Португалов В. В. и Яковлев В. А. Доклады АН СССР, 1951, 78, 5, 1021—1024.
Португалов В. В. и Яковлев В. А. Вопр. мед. химии, 1953, 5, 188—207.
Прозоровский В. И. Судебномедицинская экспертиза, 1961, 3, 3—7.
Разумов В. И., Маркович Е. А., Мухачева О. А. Сб.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1957, 194—204.

Ришан Б. Я. и Шогам А. Н. Фармакол. и токсикол., 1948, 3, 50—55.
Рожков В. М. Патология, клиника и терапия отравлений техническими жидкостями, Л., 1949.
Ромейс Б. Микроскопическая техника. М., 1953.
Русских В. В. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравлений. М., 1962, 247—250.
Рыболовлев Р. С. Фармакол. и токсикол., 1952, 3, 9—14.
Рыболовлев Р. С. Дисс. Л., 1953.
Рыболовлев Р. С. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957, 322—337.
Саватеев Н. В. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957, с. 49—53.
Сазонова Н. А., Волкова А. П., Казакова Т. П. Цит. по В. И. Вашкову и Е. В. Шнайдеру, 1962.
Сарваш Ф. Клин. мед., 1961, 1, 148—151.
Сафронов П. Н. и Савинский Я. Р. Военная токсикология и санитарно-химическая защита. Л., 1958.
Сборники официальных материалов по контролю за ядохимикатами. М., 1960, 1961, 1962.
Семенов И. В. Дисс. Л., 1958.
Семенов И. В. и Фруентов Н. К. Тезисы докладов Совещания по проблеме связи между структурой и действием лекарственных веществ. Тарту, 1956, 79—81.
Семенов И. В. и Фруентов Н. К. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957, 145—153.
Семенов И. В. и Фруентов Н. К. Сборник трудов кафедры судебной медицины I ЛМИ. Л., 1958, в. 2, 183—187.
Синицын С. Н. Фармакол. и токсикол., 1961, 5, 540—541.
Смусин Я. С. Сборник трудов кафедры судебной медицины I ЛМИ. Л., 1955, 16—21.
Смусин Я. С. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957, 143—158.
Смусин Я. С. Сборник трудов кафедры судебной медицины I ЛМИ. Л., 1958, в. 2, 187—191.
Смусин Я. С. Сб.: Клинико-физиологические наблюдения за функцией половой и мочевой систем у беременной и небеременной женщины. Л., 1961, в. 2, 359—361.
Смусин Я. С. Материалы конференции по новым методам диагностики, профилактики и лечения важнейших заболеваний и внедрения их в практику. Челябинск, 1961, 63—67.
Смусин Я. С. Сборник трудов IV Всесоюзной конференции судебных медиков. Рига, 1962, 443—445.
Смусин Я. С. Бюлл. экспер. биол. и мед., 1962, 12, 111—114.
Смусин Я. С. Материалы Научной конференции Челябинского медицинского института. Челябинск, 1963, 143—144.
Смусин Я. С. Фармакол. и токсикол., 1963, 3, 358—361.

Смусин Я. С. Сборник научных работ Челябинского общества судебных медиков. Челябинск, 1963, 157—173.
Смусин Я. С. Материалы научной конференции Челябинского медицинского института. Челябинск, 1964, 62—64.
Смусин Я. С., Астапова С. А., Баранова Л. В. Судебномедицинская экспертиза, 1961, 2, 3—6.
Смусин Я. С., Захарова А. В., Мельникова А. П., Астапова С. А., Цветков А. П., Холманов В. В., Кудинова Н. П., Тютикова О. Н., Лопотко А. И., Герасимова И. В. Сб.: Вопросы судебномедицинской экспертизы. М., 1958, в. 3, 310—319.
Смусин Я. С. и Образцов Г. Д. Материалы научной конференции Челябинского медицинского института. Челябинск, 1964, 116—118.
Смусин Я. С. и Фруентов Н. К. Судебномедицинская экспертиза, 1963, 3, 28—33.
Сосновик И. Я. Клиника и профилактика отравлений ядохимикатами. М., 1959.
Сосновик И. Я. Труды 1-й Всесоюзной конференции по гигиене и токсикологии инсектофунгицидов. М., 1959, 355—359.
Спыну Е. И. Фармакол. и токсикол., 1957, 49—53.
Стацек Н. К. Фармакол. и токсикол., 1959, 6, 559—565.
Таранович Г. Л. Тезисы докладов научной сессии Минского государственного медицинского института. Минск, 1956, 270—271.
Ундрицов М. И. Труды 1-й Всесоюзной конференции патофизиологов. М., 1952, 192—194.
Фаерман И. С., Бонгард Э. М. и др. Гигиена труда, 1961, 12, 45—47.
Фартушный А. Ф. Судебно-медицинская экспертиза, 1964, 1, 34—36.
Фруентов Н. К. Стрихнин. Руководство по фармакологии. Под редакцией Н. В. Лазарева. Т. 1. Л., 1961, 396—400.
Худяков Г. Н. Материалы к XV научной конференции аспирантов I ЛМИ. Л., 1967, 145—146.
Худяков Г. Н. Сб.: Судебно-медицинская экспертиза и криминалистика на службе следствия. Ставрополь, 1967, в. 5, 449—450.
Цапко В. Г. В кн.: Гигиена и физиология труда, производственная токсикология, клиника профзаболеваний. Киев, 1963, 79—81.
Цомая К. В. Клинические и экспериментальные материалы по изучению отравления трикрезилфосфатом. Тбилиси, 1957.
Чжан Фань. Дисс. Л., 1960.
Чернобродов Г. Д. Судебномедицинская экспертиза, 1963, 4, 44—45.
Шарапов И. М. Фармак. и токсикол., 1951, 3, 32—36.
Шарапов И. М. Вестн. офтальмол., 1952, 1, 21—23.
Шастин Р. Н. Арх. пат., 1961, 3, 3—8.
Эйдинова М. Б. и Эдельштейн Э. А. Фармакол. и токсикол., 1951, 3, 36—38.
Эфендиев Т. М. Клин. мед., 1961, 39, 126—130.

Яковлев В. А. Сб.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1962, 424—436.
Якубов А. Я. Автореф. дисс. Киев, 1964.

б) Иностранная

Abrams H. K., Hamblein D. O., Marchand I. F. JAMA, 1950, 144, 107—108.
Aldridge W. N., Davison A. N. Biochem. J., 1952, 52, 4, 663—671.
Alles G. A., Hawes R. C. Biol. Chem., 1940, 133, 375—390.
Ammon R. Pflug. Arch. Physiol., 1933, 233, 486—491.
Augustinsson K. B. Acta physiol. scand., 1948, 52.
Augustinsson K. B. Acta physiol. scand., 1955, 35, 40—52.
Bernheim F., Bernheim M. L. Pharmacol., 1936, 57, 427—436.
Bernsohn J. a. Poseley L. Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 1957, 95, 672—674.
Coers C. Cl. sic. Acad. reg. Belgique, 1954, 40, 10, 1000—1003.
De Candole C. A., Douglas W. W., Evans C. L., Holmes R., Spencer K. E. V., Torrance R. W., Wilson K. M. Brit. J. Pharmacol., 1953, 8, 4, 466—475.
Du Bois K. P., Doill G. a. Coon G. M. J. Pharmacol, 1950, 98, 6—7.
Eicken S. Ang. Chemie, 1954, 66, 17, 18, 551.
Feldberg W. Physiol Rev., 1945, 25, 596—642.
Feldberg W. Pharmacol. Rev., 1954, 6, 1, 85—93.
Feldberg W. «Acetylcholine» In the book: «Metabolism of Nervous System», ed. by Richter, Pergamon Press. London N. G., 1957.
Frawley G. P., Hagan E. C. a. Fitzhugh O. G. J. Pharmacol, 1952, 105, 156—165.
Gerebtzoff M. A. Acta Anatomia, 1953, 19, 366—379.
Giacobini E. Acta physiol. scand., 1959, 45, 156.
Giacobini E. a. Holmstedt B. Acta physiol. scand., 42, 12—27.
Gomori G. Proc. Soc. exp. Biol. a. Med., 1948, 67, 4—6.
Goodman L. a. Gilman A. The Pharmacological Basis of Therapeutics., 1955.
Gotte L. Sci. mat. e. natur., 1954—1955 (1955), 113, 33—39.
Grob D. Handbuch exp. Pharmakol. Berlin, 1963, Bd 15, ch. 22.
Grob D., Harvey A. M., Langworthy O. R., Lilienthal J. L. Bull. Johns. Hopk. Hosp., 1947, 81 257—266.
Grob D., Garlick W. L., Harvey A. M. Bull. Johns Hopk. Hosp., 1950, 87, 106—129.
Harvey A. M. a. Mac Intosh F. C. J. Physiol., 1940, 97, 408—416.
Hestrin S. J. Biol. Chem. 1949, 180, 249—261.

Hobbiger F. Chem. Ind. dec., 1954, 25, 1574.
Holmstedt B. Pharmacol. Reviews, 1959, 11, 3, 567—688.
Kahane E. et Levy J. Compt. rend. soc. Biol., 1936, 121, 1596—1600.
Kalojanova-Simeonova F. Pracov. Lek., 1962, 7, 321—323.
Kewitz H., Nashmansohn D. Arch. biochem. biophys., 1957, 66, 2, 271.
Koelle G. J. Pharm. exp. Ther., 1951, 103, 153—171.
Koelle G. B. Biochem. J., 1953, 53, 2, 217—226.
Koelle G. B. Handbuch. exp. Pharmakol. Bd 15, Berlin, 1963.
Koelle G. a. Friedenwald J. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1949, 70, 617—622.
Koelle G. B. a. Gillman A. J. Pharm. exp. Ther., 1949, 95, 4, 166—216.
Koelle W. A. a. Koelle G. B. J. Pharm. exp. Ther., 1959, 126, 1—8.
Koelle G. B. a. Steiner E. C. J. Pharm. exp. Ther., 1956, 1184, 420—434.
Kondritzer A. A. U. S. Arm. Forc. Med. J. 1956, 7, 6, 791—796.
Krayer O., Goldstein A. a. Plachte F. L. J. Pharmacol., 1944, 80(1), 8—31.
Kuhn H. H. a. Searles D. Arch. intern. pharmacodyn. et ther., 1938, 58, 88—92.
Lebrun A. Bulletin de l'organisation mondiale de la sante, 1960, 22, 5, 579.
Loewi O. u. E. Navratil Arch. ges. Physiol., 1926, 214, 678—696.
Mazur A. a. Bodansky O. J. Biol. Chem., 1946, 163, 261—276.
Metcalf K. L. Organic insecticides. New York—London, 1955.
Metcalf K. L. Advances in pest control research. V. I. Intersciense Publishers. New York a. London, 1957.
Michelson M. J., Zeimal E. V., Magazanik L. G., Kabachnik M. J. a. Godovicov N. N. Biochem. harmacol., 1961, 8, 1, 91.
Mitchell H. S. A. De Joung J. D., 1954.
Mohr E., Gerebtzoff M. A. Acta anat., 1954, 22, 2—3, 143—151.
Moore E., Petty C. J. Histochem. Cytochem., 1958, 6, 5, 377, 379.
Muratore F., Faillo A., Ponzetta G. Minerva med., 1960, 51, 80, 3342.
Nachmansohn D. Compt. rend. soc. Biol., 1938, 129, 33, 941.
Nachmansohn D. Bull soc. chim. Biol., 1939, 21, 761—796.
Nachmansohn D. Chemical and molecular Basis of Nerve activity. New York, 1959.

Nachmansohn D. a. Berman M. J. Biol. Chem., 1946, 165, 2, 561—562.
Nachmansohn D. a. Rothenberg M. A. J. Biol. Chem., 1945, 158, 3, 653—667.
Negherbon W. Handbook of toxicology. V. III. Insecticides, 1959.
O'Brien R. D. Toxic phosphorus esters. New York a. London, 1960.
Ord M. G. a. Thompson R. H. S. Biochem. J., 1950, 46, 346—351.
Ord M. G. a. Thompson R. H. S. Biochem. J., 1952, 51, 245—251.
Paton W. D. Ann. Rev. Physiol., 1958, 20, 431—470.
Petti C. S. Arch. Pathol., 1958, 66, 4, 458—463.
Plattner F. u. Galehr O. Arch. ges. Physiol., 1928, 220, 606—611.
Pribilla O. Deutsche Ztschr. gerichtl. Med., 1957, 46, 1, 79—92.
Ravin H. A., Lacks S. I. a. Seligman A. M. J. Pharm. exp. Ther., 1953, 107, 1, 37—53.
Scheiner H. C. Compt. rend. Soc. Biol., 1939, 130, 7—12, 748—752.
Schrader G. Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage organischer Fluor—und Phosphor-verbindungen. Monogr., 1952.
Schweitzer A. E., Stedman E. a. Wright S. J. Physiol., 1939, 96, 3, 302—337.
Thompson R. H. S. Brit. med. Bull., 1953, 9, 2, 138—141.
Ueda K. Jap. J. Publ. Health., 1957, 4, 7, 341—346.
Walters M. N. I. Med. J. Australia, 1957, 44, 1, 25, 876—877.
Whittaker V. P. Physiol. Rev., 1951, 31, 312—343.
Wilson J. B. Biochem., Biophys. Acta, 1951, 7, 520—525.
Petersohn F. Arch. Toxicol., 1965, 21, 3, 168—174.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 3
Глава I. **Холинэстераза и антихолинэстеразные вещества (Краткие сведения)** 5
Биологическая роль холинэстеразы 5
Антихолинэстеразные вещества и их практическое применение 8
Общие сведения об отравлении антихолинэстеразными веществами 14
Глава II. **Методы определения холинэстеразы** 29
Биологический метод 30
Биохимический метод 40
Гистохимический метод 45
Глава III. **Активность холинэстераз в здоровом организме и при некоторых патологических состояниях** 58
Уровень холинэстеразной активности крови 58
Уровень активности холинэстеразы органов и тканей . 66
Активность холинэстеразы головного мозга, определяемая в «кусочке неразведенной ткани» 75
Состояние активности холинэстеразы тканей в зависимости от давности смерти 80
Глава IV. **Отравления антихолинэстеразными веществами необратимого действия и их посмертная диагностика** . 85
Глава V. **Отравления антихолинэстеразными веществами обратимого действия и их посмертная диагностика** . . 138
Глава VI. **Схема судебно-медицинской диагностики отравлений антихолинэстеразными веществами** 178
Литература 182

Смусин Яков Семенович
Судебно-медицинская экспертиза отравлений антихолинэстеразными веществами

Редактор *В. В. Томилин*
Техн. редактор *Н. А. Пошкребнева* Корректор *Н. П. Проходцева*
Художественный редактор *Т. М. Дмитриев*

Сдано в набор 11/III 1968 г. Подписано к печати 24/IX 1968 г. Формат бумаги 84×108 1/32=6,0 печ. л.+0,19 печ. л. вкл. (условных 10,40 л.) 10,32 уч.-изд. л. Бум. тип. № 1. Тираж 5000 экз. Т 12813 МН—73.

Издательство «Медицина». Москва Петроверигский пер., 6/8.
Типография изд-ва «Горьковская правда», г. Горький, ул. Фигнер, 32.
Заказ 5272. Цена 1 р. 13 коп.

. . . . . ства 3
. 5
. . . . при- 5
. . . . ными 8
. . . . 14
. . . . 29
. . . . 30
. . . . 40
. . . . 45
зме
. . . . 58
. . . . 58
. . . . 66
яе-
. . . . 75
си-
. . . . 80
ми
. . . . 85
ми
. . . . 138
е-
. . . . 178
. . . . 182
. .
и
одцева
умаги
д. л.
32.

1 р. 13 к.

МЕДИЦИНА — 1968

Я.С.СМУСИН